

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



Eliška Krýsová

Nestrukturní proteiny virů Zika a Dengue s enzymovou aktivitou
Nonstructural proteins of Zika and Dengue virus with enzyme activity

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9.5.2018

Eliška Krýsová

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. et PharmDr. Taťáně Majerové, Ph. D. za její trpělivost, vstřícnost a cenné rady, svému školiteli a vedoucímu skupiny doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za možnost vypracování bakalářské práce v jeho laboratoři a za veškerou podporu. Dále patří můj dík všem kolegům z výzkumné skupiny Proteas lidských patogenů na ÚOCHB v Praze za vřelé přijetí a přátelskou atmosféru během práce. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu po celou dobu studia.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Replikační cyklus flavivirů.....	2
3. Proteiny - úvod.....	5
3.1 Strukturní proteiny	5
3.1.1 C protein (kapsidový, z angl. capsid)	5
3.1.2 M protein (membránový)	6
3.1.3 E protein (obalový).....	6
3.2 Nestruturní proteiny	7
3.2.1 NS1	7
3.2.2 NS2A	7
3.2.3 NS4A	8
3.2.4 NS4B	8
4. Proteiny s enzymovou aktivitou a jejich kofakory	8
4.1 NS2B	8
4.1.1 Struktura NS2B	8
4.1.2 Funkce NS2B	9
4.2 NS3.....	10
4.2.1 NS3pro.....	10
4.2.1.1 Struktura NS3pro.....	11
4.2.1.2 Funkce NS2B-NS3pro.....	13
4.2.2 NS3hel	14
4.2.2.1 Struktura NS3hel	15
4.2.2.2 Funkce NS3hel a NTPasy.....	18
4.3 Role NS4B.....	18
4.4 NS5.....	19
4.4.1 MTasa.....	19
4.4.1.1 Struktura MTasy.....	19
4.4.1.2 Funkce	21
4.4.2 RNA-dependentní-RNA-polymerasa	23
4.4.2.1 Struktura RdRP.....	23
4.4.2.2 Funkce RdRP.....	25
4.4.3 Spojení MTasové a RdRP domény.....	26
4.5 Interakce NS3 a NS5 proteinu	27
5. Závěr.....	28
6. Seznam literatury.....	29

Seznam zkratek

AMPPMP	5'-adenylyl- β,γ -imidodifosfát	NLS	jaderný lokalizační signál
ATP	adenosintrifosfát	NS	nestruturní protein
Axl, Tyro3	tyrosin-kinasové receptory z rodiny TAM	NS3hel	NS3 helikasa
BPTI	pankreatický bovinní inhibitor trypsin, aprotinin	NS3pro	NS3 proteasa
C protein	kapsidový protein	NTP	nukleosidtrifosfát
CM	specificky stočená membrána	prM protein	prekursor membránového proteinu
DC-SIGN	interleukin C typu	RANTES	chemokin, z angl. regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted
DENV	virus Dengue	RC	replikační komplex
DHF	hemoragická horečka Dengue	RdRP	RNA-dependentní-RNA-polymerasa
DNA	deoxyribonukleová kyselina	RNA	ribonukleová kyselina
DSS	Dengue syndrom toxického šoku	RTPasa	RNA trifosfatasa
E protein	obalový protein	SAH	S-adenosylhomocystein
EM	endoplasmatické retikulum	SAM	S-adenosyl-L-methionin
Fc γ r	receptor interagující s oblastí Fc na imunoglobulinech G	SLA	smyčka A
GA	Golgiho aparát	STAT2	signální transduktor a aktivátor transkripce 2
GMP	guanosinmonofosfát	STING	stimulátor genů interferonu
GTasa	guanylyltransferasa	TIM	fosfatidylserinový receptor (z angl. transmembrane immunoglobulin and mucin)
GTP	guanosintrifosfát	TAM	rodina tyrosin-kinasových receptorů
HCV	virus hepatitidy typu C	UTR	netranslatovaná oblast
Hsp	protein teplotního šoku	WNV	virus západonilské horečky
JEV	virus japonské encefalitidy	YFV	virus žluté zimnice
LPS	lipopolysacharid	ZIKV	virus Zika
M protein	membránový protein		
MTasa	methyltransferasa		
NF- κ B	jaderný faktor κ B		

Abstrakt

Viry Zika a Dengue kódují vlastní enzymy, které jsou aktivní v různých stádiích replikačního cyklu. NS3, NS5 protein a jejich kofaktory hrají nepostradatelnou roli ve fungování flavivirů. I když byly struktury těchto proteinů již vyřešeny, jejich vlastnosti jsou prozkoumány jen částečně a mnoho aspektů ohledně jejich funkce zůstává nevyřešeno. Hlavními tématy této práce je úloha NS3 a NS5 proteinu v životním cyklu virů Zika a Dengue, sestřih polyproteinového prekurzoru, samotná replikace a interakce těchto enzymů s dalšími strukturními a nestrukturními proteiny. NS3 a NS5 protein mají mnoho enzymatických aktivit strukturně i funkčně oddělených, což je činí zajímavými z hlediska výzkumu autoaktivace, interakce funkčních domén a proteinů mezi sebou. Jelikož jsou infekce viry Zika a Dengue stále velmi vážným problémem, je nezbytné co nejlépe pochopit molekulární mechanismy jejich replikace.

Klíčová slova: proteasa, polymerasa, Zika, Dengue, sestřih polyproteinů, protivirová terapie

Abstract

Zika and Dengue viruses codes their own enzymes which helps them in different stages of the replication cycle. NS3 a NS5 proteins and their cofactors play an essential role in flaviviral life cycle. Although their structure was already solved, many aspects of their function remain unclear. The main subject of this bachelor thesis is the role of these proteins in flaviviral life cycle, polyprotein cleavage, replication and protein-protein interaction. These enzymes keep many particular enzymatic activities such as protease, helicase, methyltransferase and polymerase. They are both structurally and functionally separated, which is interesting regarding autoactivation and protein-protein interaction. Since Zika and Dengue infections remain a serious health care issue, it is necessary to understand the molecular mechanisms behind their replication.

Keywords: protease, polymerase, Zika, Dengue, polyprotein processing, antiviral therapy

1. Úvod

Viry Zika a Dengue jsou stálou hrozbou pro obyvatele Země. Patří do čeledi *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus* společně s dalšími viry způsobující tropická i různá jiná onemocnění. Viry této čeledi můžeme rozdělit podle způsobu přenosu na přenášené (i) komáry (z angl. mosquito-born), (ii) klíšťaty (z angl. tick-born) a na viry, u nichž je způsob přenosu neznámý (iii). Do první skupiny patří kromě virů Zika a Dengue ještě virus západonilské horečky, virus žluté zimnice nebo virus Kunjin. Druhá skupina zahrnuje viry s výskytem i v mírném pásmu, mezi nejznámější tato onemocnění patří klíšťová encefalitida, jež patří mezi nejčastější onemocnění způsobené klíšťaty v České republice (Hönig et al. 2015). Posledními jmenovanými byly viry, u nichž není způsob přenosu není znám. Mezi tyto se řadí virus Dakar nebo virus Rio Bravo, nejsou však příliš rozšířené (Kuno et al. 1998).

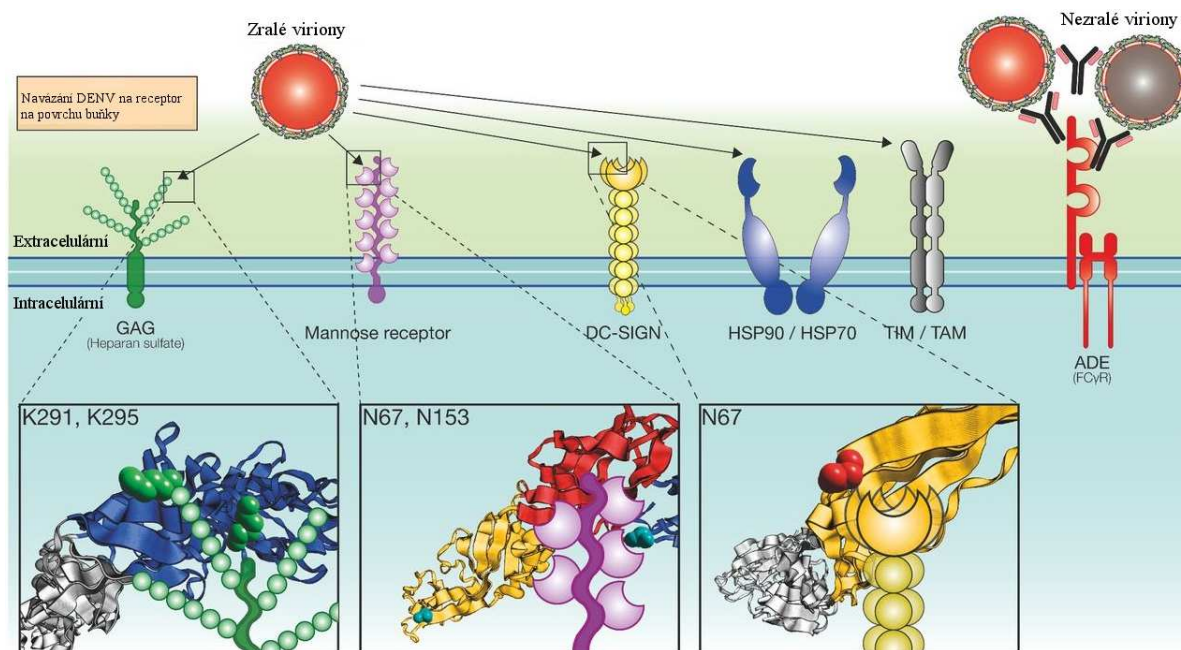
Přírodním rezervoárem viru Dengue (DENV) jsou komáři rodu *Aedes*, kteří se množí v blízkosti lidských obydlí a oblasti endemické pro Dengue (subtropy a tropy) korespondují právě s místem výskytu komára (Bhatt et al. 2012). Každý rok je nakaženo 390 milionů lidí, z čehož u 100 milionu lidí propukne onemocnění (Bhatt et al. 2012). Existují čtyři sérotypy viru, vykazující sekvenční podobnost 65% a všechny způsobují onemocnění (Bharaj et al. 2008). DENV může způsobovat hemoragickou horečku (DHF – z angl. Dengue hemorrhagic fever) a syndrom toxického šoku (DSS – Dengue shock syndrom). Pokud je zajištěna včasná lékařská pomoc, je mortalita nižší než 1% všech nakažených. Mírnější formy nemoci způsobují horečku, bolesti hlavy, svalů a bolesti za očima (Ong et al. 2007).

Zika virus (ZIKV) je spojován s kongenitálními malformacemi mozku – mikrocefaliemi dětí, jejichž matky byly nakaženy virem Zika během těhotenství (Brasil et al. 2017). Důkazy pro toto spojení jsou mnohé, avšak stále ne zcela průkazné. Objevuje se i souvislost nákazy ZIKV a Guillain-Barré syndromem, což je onemocnění způsobující paralýzu nervů vedoucí k ochrnutí celého těla (Salvador 2016). U zdravých jedinců se objevují příznaky typu chřipky, mnohem mírnější než u nákazy virem Dengue. V mnoha případech probíhá infekce asymptomaticky. Je zde ale nebezpečí chronické infekce a dalších post-infekčních komplikací (Da Silva et al. 2017).

Tato bakalářská práce se zabývá hlavními enzymy flavivirů nezbytnými pro replikační cyklus virů z hlediska struktury a funkce. Proteasa, helikasa, RNA dependentní RNA polymerasa a další proteiny rozebírané v této práci jsou velmi důležité pro fungování replikačního cyklu virů, a proto je mým cílem proniknout hlouběji do problematiky těchto enzymů, nastínit jejich fungování a podat informace o hlavních terapeutických cílech. Znalost těchto cílů by mohla pomoci v návrhu nových inhibitorů a vakcín proti virům Zika a Dengue.

2. Replikační cyklus flavivirů

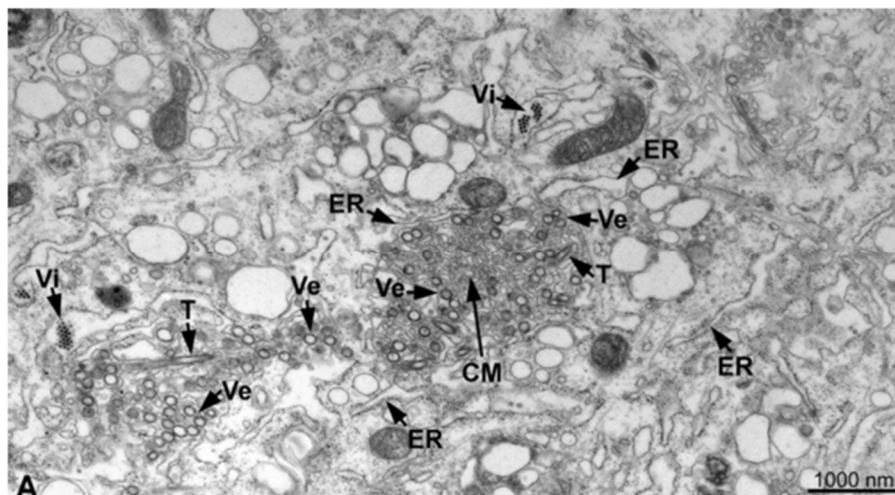
Flaviviry jsou obalené viry, vstup do buňky je realizován receptorem zprostředkovanou endocytózou. Receptory pro Dengue jsou velmi různorodé, z těch, co nejsou znázorněny na obr. 1, mezi ně patří dále lipopolysacharidový receptor CD14 či 37/67-kDa laminin s vysokou afinitou (z angl. high-affinity laminin) (Hundt et al. 2001). ZIKV vstupuje do buňky zejména přes DC-SIGN, TIM/TAM receptory či přes tyrosin-kinasové receptory jako je Axl či Tyro3 (Hamel et al. 2015).



Obr. 1: Navázání DENV-2 na povrch buňky a příklady receptorů, které se zapojují do rozpoznávání, navázání a internalizace virionů. Jedná se o receptory GAGs (glykosaminoglykany), manosový receptor (lektin), DC-SIGN (z angl. Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin – taktéž lektin C typu (vázející vápník)), HSP90/HSP70 (z angl. heat shock proteins – proteiny tepelného šoku), TIM/TAM (speciální rodina transmembránových receptorů, z rodiny fosfatidylserinových receptorů, viz Meertens et al. 2012), Fcγr (z angl. fragment crystallizable region – oblast protilátky interagující s Fc receptorem). (převzato a upraveno dle Cruz-Oliveira et al. 2015)

Virus je dopraven pomocí sekretorických váčků do pozdního endosomu, odkud je uvolněn pomocí fúze membrán. Existuje mnoho různých buněk permissivních pro flaviviry. DENV napadá u lidí primárně buňky mononukleárního fagocytárního systému (Jessie et al. 2004), cílem primární infekce ZIKV jsou kožní fibroblasty a keratinocyty (Hamel et al. 2015). Díky permissivitě spermií pro tento virus může být přenášen i sexuálně (Bagasra et al. 2017). Virová genetická informace již je ve formě +RNA (znamená to, že může rovnou sloužit jako mRNA), takže nemusí docházet k úpravě nukleové kyseliny a jako taková může být rovnou translatována. Chová se jako hostitelská mRNA, na 5' konci má methylguanosinovou čepičku ($m^7G(5')_{ppp}(5')A_m$), která chrání RNA před degradací. 3' konec je zakončen $-CU_{OH}$ (Wengler and Wengler 1981). Po endocytóze je RNA transportována do endoplazmatického retikula, kde

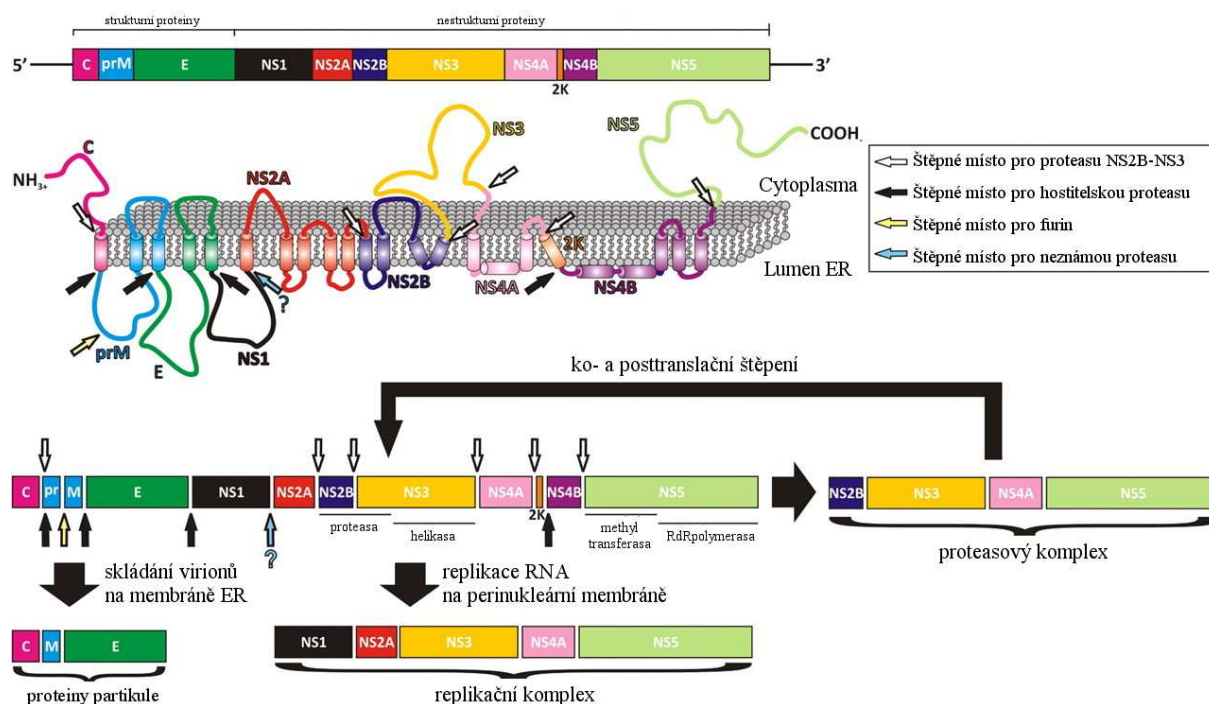
probíhá translace. Endoplasmatické retikulum je působením proteinu NS4A reorganizováno, objevují se zde útvary typu specificky stočená membrána (z angl. convoluted membrane), váčkovité útvary (z angl. vesicle packets, virus-induced vacuoles, paracrystalline arrays) (Mackenzie, Jones, and Young 1996) (Welsch et al., 2009) (obr. 2), jež ukotvují virový replikační komplex, napomáhají při maturaci virionů a mohou být místem ukládání proteinů.



Obr. 2: Řez Huh-7 buňkami infikovanými DENV-2 fixovanými 24h po infekci. Označené struktury představují virem indukované útvary: CM – z angl. convoluted membrane (specificky stočená membrána), T – tubes (trubičky), Ve – z angl. virus-induced vesicles (váčky). Vi – virové partikule, ER – endoplasmatické retikulum. Snímek byl pořízen transmisním elektronovým mikroskopem. (Welsch et al. 2009)

Většina flavivirů nemá typickou Kozakové sekvenci, ale jen několik AUG míst před správným AUG kodonem. DENV využívá RNA vlásenku kovalentně spojenou s kapsidovým proteinem, aby zastavila ribozom a mohlo dojít k translaci (Clyde & Harris, 2006).

Flaviviry využívají polyproteinové strategie translace (obr. 3), celý protein je nasyntetizován vcelku a pak rozstříhán pomocí virových i hostitelských proteas na tři strukturní C – kapsidový, (z angl. capsid), prM – prekursor membránového (z angl. membrane), E – obalový (z angl. envelope) a osm nestrukturních (z angl. nonstructural) – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B a NS5 proteinů (Rice et al., 1985). Proteiny prM, E a NS1 jsou obráceny do lumen, zatímco NS3, NS5 a C do cytoplasmy. Zbytek proteinů je převážně hydrofobních s malými hydrofilními úseky (Assenberg et al., 2009). Hostitelská signální peptidasa štěpí mezi C/prM, prM/E, E/NS1 a 2K/NS4B; NS3 protein (virová proteasa) také mezi C/prM a navíc i mezi NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K a NS4B/NS5 (Biedrzycka et al. 1987). Mechanismus štěpení mezi NS1/NS2A nebyl dosud popsán, stejně jako nebyla nalezena proteasa zodpovědná za toto štěpení (Addis et al. 2015).



Obr. 3: Polypeptidový komplex flavivirů. Nahoře jsou proteiny rozděleny na strukturální a nestrukturální. Uprostřed je naznačena pozice proteinů na membráně endoplasmatického retikula a hlavní transmembránové segmenty jednotlivých proteinů. Dole jsou různobarevnými šipkami naznačeny štěpící místa a enzymy, které tyto štěpení provádějí. (převzato a upraveno dle Assenberg et al. 2009)

Stejně jako musí být upravena RNA, než je zabalena do kapsidy (syntézou 5' čepičky), i některé virové proteiny procházejí modifikacemi. K nim řadíme například glykosylaci proteinu E, jež je zodpovědná za vyšší infektivitu a snazší fúzi membrán u DEN2V (Bryant et al., 2007), N-glykosylace byly též pozorovány u prM a NS1 (Crabtree, Kinney, and Miller 2005).

Jelikož musí být uskutečněno mnohem více translací než replikací (strukturální proteiny jsou potřeba v mnoha kopiích), dochází po translaci k transkripci původní +ssRNA na -ssRNA a tedy k vytvoření dsRNA intermediátu, který slouží jako templát pro transkripci velkého množství +ssRNA molekul. Nestrukturální proteiny tvoří replikační komplex (RC) spolu s RNA a hostitelskými buněčnými faktory. RC umožňuje ukotvení těchto proteinů k membráně ER, přestavění této membrány a díky nově vytvořeným kompartmentům také ochranu před hostitelskými obrannými mechanismy (Welsch et al., 2009).

Skládání virových částic (z angl. assembly) probíhá na membráně ER a maturace virionů je dokončena během transportu skrz trans-Golgi síť. Proteiny tvořící glykoproteinový obal (E a M) se nacházejí ve dvou konformačních stavech, díky tomu můžeme rozeznávat tzv. „ostrý“ povrch (z angl. „spiky“) (mají ho nezralé virové částice) a „hladký“ povrch virionů (z angl. „smooth“) (mají ho zralé virové částice). Konformační změny na E proteinu jsou spuštěny nízkým pH (5,8-6,0) v ER (Yu et al. 2008). Štěpení prekurzoru proteinu M pomocí proteasy

furinu probíhá v lumen endoplazmatického retikula. Peptid pr chrání E protein od poškození důsledkem nízkého pH při transportu sekretorickou dráhou (Zheng, Umashankar, and Kielian 2010). Zralé viriony (po disociaci peptidu pr) opouštějí buňku exocytózou přes GA a trans-GA a mohou infikovat nové buňky.

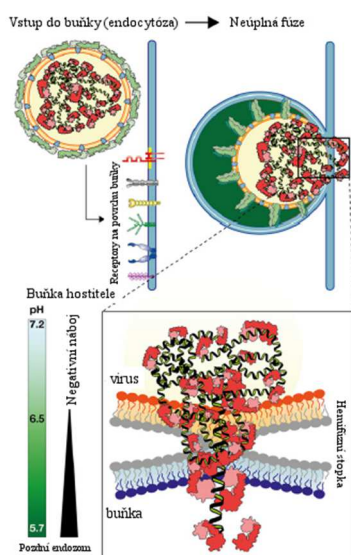
3. Proteiny - úvod

3.1 Strukturní proteiny

3.1.1 C protein (kapsidový, z angl. capsid)

Kapsida virů je proteinový obal nukleové kyseliny, který ji chrání, interaguje s hostitelskou buňkou a v případě neobalených virů je to jediná struktura, která odděluje genom virů od vnějšího prostředí. Je tvořena kapsidovým proteinem tvořícím oligomery, jež mohou mít uspořádanou (ikosaedrální, helikální) nebo neuspořádanou (amorfní) strukturu.

C protein je krátký, pozitivně nabitý protein (114 aminokyselin), vyskytuje se ve formě dimeru. Každý protomer se skládá ze čtyř alfa helixů. Helixy $\alpha 4$ - $\alpha 4'$ obsahují úseky bohaté na arginin a díky tomu mohou interagovat s virovou RNA (ta má totiž záporný náboj, kdežto Arg je kladně nabitá aminokyselina). Naproti tomu $\alpha 1$ - $\alpha 1'$ a $\alpha 2$ - $\alpha 2'$ jsou nenabitě úseky a interagují s membránou (Ma et al. 2004). Nukleokapsida virů Zika a Dengue postrádá pravidelné uspořádání, je amorfní (João M. Freire et al. 2015). Během fúze membrán v pozdním endozomu (při uvolňování RNA do cytoplazmy) interaguje kapsidový protein s obalovým glykoproteinem. Je pravděpodobné, že C protein přenáší genom flavivirů přes napůl spojenou membránu (z angl. hemifused membrane) (obr. 4) (João M. Freire et al. 2015).



Obr. 4: Mechanismus přenosu RNA flavivirů přes napůl spojenou (z angl. hemifused) membránu. Vlevo nahoře je naznačen vstup viru přes různé receptory na membráně hostitelské buňky. Poté je virus dopraven do pozdního endosomu, kde vlivem pH dochází k strukturálním změnám v E proteinu (na obrázku zeleně) a také ke změnám ve složení lipidové membrány. Díky tomu dochází k částečné fúzi membrán a k uvolnění nukleokapsidy do cytosolu. Membránový protein vyznačen modře, kapsidový protein, který tvoří homodimery, je vybarven červeně a růžově). (převzato a upraveno dle João M. Freire et al. 2015)

Kromě toho patří kapsidový protein mezi supernabitě (z angl. supercharged) proteiny (Joao Miguel Freire et al. 2013). Tento protein také hraje důležitou roli při translaci celého

polyproteinu. Jak už bylo řečeno v předchozí kapitole, pro rozpoznání správného AUG kodonu je využívána RNA vlásenka spojená právě s C proteinem (z angl. hairpin – cHP), která se tvoří 14 nukleotidů za prvním AUG kodonem. Tato vlásenka a způsob iniciace translace jsou s malými obměnami konzervovány napříč flaviviry přenášenými komáry (Clyde and Harris 2006).

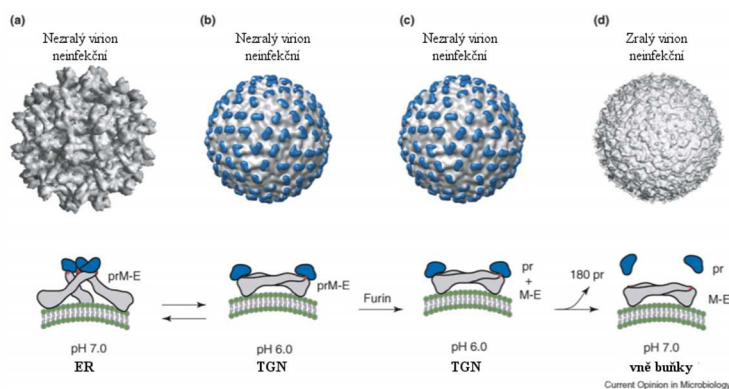
3.1.2 M protein (membránový)

Tento strukturní protein se vyskytuje většinu replikačního cyklu v podobě prekurzoru glykoproteinu prM. Při štěpení prM dochází ke zpoždění štěpení signální peptidasou dokud není rozštěpen a sbalen C protein. Po sestřihu polyproteinu napomáhá prM správnému sbalení E proteinu a naopak E protein zvyšuje rychlost štěpení N konce prM (Lorenz et al. 2002). M protein je vyštěpen z prekurzoru pomocí furinu v trans-Golgi a pr se váže na E protein a tvoří tzv. fúzní smyčku (z angl. fusion-loop), která je zodpovědná za fúzi membrán při uvolnění virionu z buňky (Oliveira, de Alencastro, and Horta 2017).

3.1.3 E protein (obalový)

Obalový glykoprotein E je největší ze strukturních proteinů virů Zika a Dengue. V obou případech je N-glykosylován (Bryant et al. 2007). U viru ZIKA byla prokázána snížená infektivita u mutantních virionů, jejichž obalový glykoprotein nebyl glykosylován (Mossenta et al. 2017). E protein tvoří hlavní část povrchu virionů, 180 kopií je uspořádáno do 90 dimerů tvořících vzor rybí kosti (z angl. herringbone pattern) (Kuhn et al. 2002). E protein se skládá ze tří strukturně i funkčně odlišných domén. Doména I se skládá z osmi β -řetězců tvořících β -barelovou strukturu. Je zodpovědná za organizaci proteinu. Doména II obsahuje dvanáct β -řetězců a dva α -helixy. Fúzní peptid (ta část proteinu zodpovědná za fúzi membrán) se nachází v rámci DII domény. Za normálních okolností je překryt prM proteinem nebo se nachází v hydrofobní kavitě tvořené doménami DI a DIII. Za interakci s receptorem na povrchu buňky je zodpovědná doména DIII, která má strukturu podobnou IgC molekule, s deseti β -řetězci (Modis et al. 2003).

V pozdním endosomu dochází vlivem nízkého pH ke konformačním změnám na E proteinu a k odhalení fúzního peptidu, následkem čehož dochází k fúzi membrán a k uvolnění virové nukleokapsidy do cytoplasmy (Oliveira, de Alencastro, and Horta 2017). Po translaci je při normálním pH na ER utvořen heterodimerní komplex prM-E, který se organizuje do šedesáti trimerních „hrotů“ (z angl. spikes). V nízkém pH se v Golgiho aparátu (GA) opět díky konformačním změnám formují dimery prM-E, které leží paralelně s membránou (Q. Zhang et al. 2012) (obr. 5).



Obr. 5: Struktura virionu dengue a konformace E proteinu během maturace. (a) kryo-EM rekonstrukce nezralé virové částice v neutrálním pH. E protein je v komplexu s prM a tvoří dohromady 60 trimerních „hrotů“ (z angl. spikes). Konformace E proteinu (šedá) a prM (modrá) v hrotu je znázorněna níže. (b) Tatáž rekonstrukce při nižším pH v trans-Golgi váčcích. Díky nižšímu pH utvoří heterodimery E-prM 90 uspořádanějších struktur, které kopírují povrch virové membrány a virion získává „hladký“ tvar. (c) Během transportu v TGN dochází ke štěpení prM

pomocí furinu (hostitelská endoproteasa), ale pr peptid stále zůstává jako kryt E proteinu. (d) Rekonstrukce zralé virové částice, po štěpení je virion sekretován z buňky a dochází k disociaci pr peptidu od M (naznačen červenými body). (převzato a upraveno dle Perera and Kuhn 2008)

3.2 Nestrukturní proteiny

3.2.1 NS1

Úloha NS1 proteinu spočívá v rané fázi replikačního cyklu, kdy tento protein tvoří homodimery a pomáhá ukotvení replikačního komplexu (RC) v membráně díky interakcím s NS4A a NS4B. Během virové infekce je mohutně sekretován v hexamerní podobě, je to hlavní virový toxin a jeho přítomnost v krvi se používá jako hlavní diagnostický marker u potenciálně nakažených pacientů (Gutsche et al. 2011). NS1 totiž stimuluje tvorbu autoprotilátek, které reagují s endoteliálními buňkami, se složkami extracelulární matrix a s integriny. Tímto přispívá k rozvoji těžších příznaků nákazy virem Dengue, jako je hemoragická horečka (z angl. DHF – dengue hemorrhagic fever) a syndrom šoku (z angl. DSS – dengue shock syndrome). DSS má podobné projevy jako bakteriální sepse způsobená lipopolysacharidem (LPS), což je hlavní bakteriální toxin. Dochází k masivní produkci cytokinů, nazývané jako „cytokinová bouře“. (Modhiran et al. 2015). Důvodem hemoragické horečky je zvýšení permeability endoteliálních buněk a následně větší propustnost cév vlivem sekrece NS1 (Modhiran et al. 2015) (Beatty et al. 2015). Tento protein také zprostředkovává aktivaci komplementu a interaguje s proteiny účastnícími se komplementační kaskády (Avirutnan et al. 2006).

3.2.2 NS2A

NS2A je malý hydrofobní protein (22 kDa), jehož úloha v replikačním cyklu DENV a ZIKV a v imunitní reakci hostitele nebyla stále zcela objasněna. Byly provedeny studie (především u viru Dengue), v nichž se zjistilo, že exprese tohoto proteinu inhibuje interferonovou odpověď (Munoz-Jordan et al. 2003). NS2A má 5 transmembránových domén a jeden alfa helix, který interaguje s membránou ER, ale neprochází jí. Mutagenní analýzy některých aminokyselinových zbytků tohoto proteinu ukazují na roli NS2A proteinu při skládání virových částic a při uvolnění viru z buňky (Xie et al. 2013). U viru Zika bylo zjištěno, že NS2A protein způsobuje redukci proliferace a změny v diferenciaci gliových buněk. Zkoumá

se také možnost interakce tohoto proteinu s komponenty komplexu adhezních spojů. Zjistilo se, že NS2A protein může za destabilizaci tohoto komplexu a redukci počtu adhezních spojů v mozku (Yoon et al. 2017).

3.2.3 NS4A

Tento malý hydrofobní protein indukuje reorganizaci membrány ER a tvorbu speciálních membránových útvarů (váčky, stočená membrána, viz výše), které jsou nezbytné ke správnému štěpení NS4A/2K/NS4B (Miller et al. 2007). Stejně jako NS1 protein interaguje s replikačním komplexem a pomáhá jeho ukotvení v membráně ER (Lindenbach and Rice 1999). NS4A tvoří oligomery, které zřejmě napomáhají stabilitě tohoto proteinu (v opačném případě, pokud byly některé aminokyseliny mutovány, vedlo to až k atenuaci replikace) (Lee et al. 2015) (Stern et al. 2013). Při infekci virem ZIKA dochází k nárůstu autofagie v neurálních kmenových buňkách plodu, za což jsou zodpovědné proteiny NS4A a NS4B (Liang et al. 2016).

3.2.4 NS4B

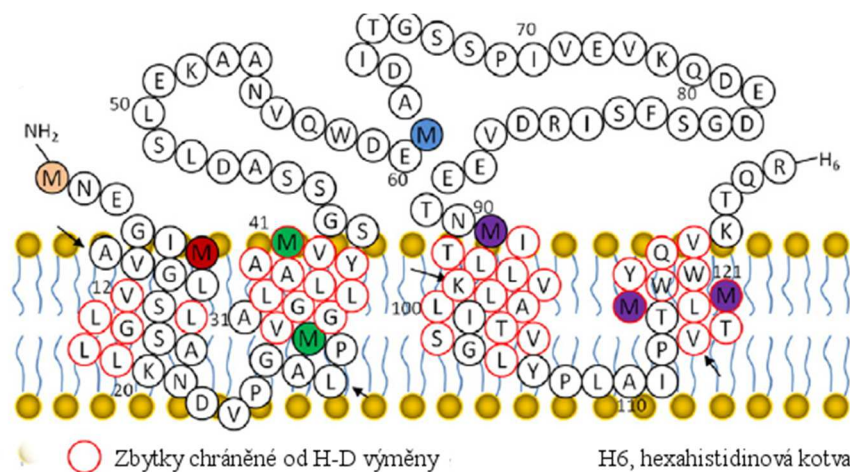
NS4B interaguje s C' terminální částí NS3 proteinu, tedy s helikasovou doménou a je jejím kofaktorem (Umareddy et al. 2006). Důležitá interakce je též s proteinem NS4A při tvorbě replikačního komplexu, mutace v těchto proteinech zásadně ovlivnily replikaci u DENV, došlo k výraznému snížení, v některých případech dokonce k úplnému zrušení tohoto procesu. (Jing Zou, Xie, et al. 2015). Na rozdíl od NS4A, NS4B tvoří dimery (J. Zou et al. 2014).

4. Proteiny s enzymovou aktivitou a jejich kofaktory

4.1 NS2B

4.1.1 Struktura NS2B

NS2B je malý membránový protein (14 kDa), který je znám jako kofaktor NS3 proteasy. Má 4 alfa helixy pojmenované $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ a $\alpha 4$, o nichž se předpokládá, že jsou zanořené do membrány a tvoří transmembránové úseky tohoto kofaktoru (viz obr. 6). Úsek mezi $\alpha 2$ a $\alpha 3$ netvoří alfa helix a v přítomnosti NS3 proteasy má tendenci skládat se do β -listů. Naopak, pokud proteasa přítomná není, tato oblast zaujímá nestabilní konformaci. Helix $\alpha 1$ vykazuje větší pohyblivost než ostatní helixy. Uvažovalo se, že by to mohl být amfifilní helix, což nakonec nebylo prokázáno (Y. Li et al. 2015). Membránová lokalizace byla zkoumána pomocí purifikace NS2B-NS3pro s mikrosomální membránovou frakcí (Clum, Ebner, and Padmanabhan 1997) a dále potvrzena pomocí vodík/deuteriové výměny (z angl. H/D exchange), která ukázala, že vodíky, jež byly uchráněny od výměny, jsou součástí úseků zanořených v membránách (Y. Li et al. 2015).



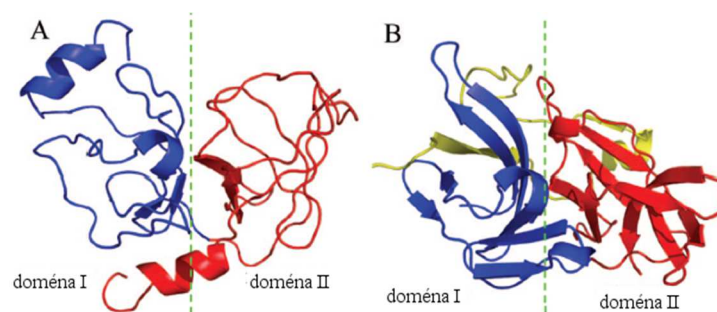
za aktivaci proteasové domény NS3. (převzato a upraveno dle Y. Li et al. 2015)

Obr. 6: Membránová topologie NS2B proteinu viru Dengue. Aminokyseliny v červených kroužcích jsou ty, které byly v H/D experimentu chráněny od výměny, jsou součástí membrány. Barevně označené methioniny jsou rozdělené do čtyřech skupin (podle barvy) na základě svých relaxačních parametrů. NS2B tedy tvoří čtyři transmembránové helixy a smyčka mezi helixy $\alpha 2$ a $\alpha 3$ je zodpovědná

Experimenty, při nichž byla zkoumána aktivita proteasy NS2B-NS3pro, prokázaly zvýšenou štěpící schopnost při přítomnosti mikrosomálních membrán. Při absenci mikrosomální frakce se však ukázalo, že samotná hydrofilní doména NS2B proteinu stačí ke správnému štěpení NS2B/NS3 (Clum, Ebner, and Padmanabhan 1997). Tato doména, ohraničená hydrofobními $\alpha 2$ a $\alpha 3$ helixy, obsahuje 40 aminokyselin a je konzervována napříč flaviviry. Mutagenní analýzou bylo zjištěno, že tato doména je jediná esenciální část NS2B pro cis i trans štěpení NS2B/NS3 (Falgout, Miller, and Lai ' 1993) (Wu et al. 2003).

4.1.2 Funkce NS2B

Nestrukturní protein NS2B tvoří komplex s N-terminální částí NS3 proteinu, který je známý jako NS2B-NS3pro proteasa. NS2B interaguje i s jinými nestrukturními proteiny, například s NS4A a NS4B v replikačním komplexu. N-terminální část NS2B stabilizuje enzym, C-terminální část se podílí na tvorbě vazebného místa pro substrát. Je velmi flexibilní a může zaujímat různé konformace (Erbel et al. 2006). Díky NS2B je NS3pro v proteasovém komplexu mnohem rigidnější (mohou za to hlavně vodíkové můstky a hydrofobní interakce). NS2B se chová jako ruka, přičemž „palec“ je zanořen mezi dvě nestrukturované smyčky v doméně I a ostatní „prsty“ svírají doménu II NS3pro proteasy (Choksupmanee et al. 2012). Díky této interakci se nestrukturované smyčky v NS3pro mění v β -struktury a navíc dojde k vytvoření pěti dalších interakčních míst pro vazbu substrátu, díky čemuž se zvyšuje katalytická aktivita komplexu. (obr. 7) (Zuo et al. 2009).



Obr. 7: Model struktury NS3 proteinu DENV v přítomnosti a nepřítomnosti kofaktoru NS2B. (A) NS3pro struktura (PDB kód 1DF9) v nepřítomnosti kofaktoru. Doména I vybarvena modře, doména II červeně. (B) Struktura komplexu NS2B-NS3 (PDB kód 2FOM). Kofaktor způsobí reorganizaci NS3pro jako molekulární chaperon. NS2B vybarven žlutě. (převzato a upraveno dle Zuo et al. 2009)

NS2B se tedy chová jako molekulární chaperon NS3pro. Všechny tyto funkce zabezpečuje hydrofilní část tohoto proteinu, zatímco dvě terminální hydrofobní části zabezpečují asociaci proteasy k membráně. Mechanismus aktivace NS3pro pomocí NS2B je dvojího charakteru. Jednak sbalení NS3pro do správného tvaru tak, aby byla enzymaticky co nejaktivnější, a jednak tvorba sekundárních vazebných míst pro správné navázání substrátu (Zuo et al. 2009). Většina prací zabývajících se strukturní problematikou NS2B ho používají bez transmembránových domén, které, jak už bylo řečeno výše, nejsou potřeba k aktivaci proteasové domény NS3. Tato hydrofilní doména je připojena k NS3 přes spoj Gly₄-Ser-Gly₄.

U DENV nebyl objeven žádný rozdíl v aktivitě proteasy v závislosti na použití spoje (G₄SG₄) nebo ponechání přirozeného štěpného místa, ale mění se dynamika proteasy. Naopak, v poslední době se hlavně při návrzích inhibitorů proteasy upouští od použití kovalentně vázaného linkeru kvůli zkoumání přirozeného fungování štěpení (Shannon et al. 2016).

U ZIKV bylo publikováno, že konstrukty s výše zmíněným spojením nebo konstrukty s NS2B postrádajícím hydrofobní úseky mohou být méně vhodné pro studium inhibitorů, protože mohou stéricky bránit navázání substrátu nebo inhibitoru do aktivního místa enzymu a snižovat jeho proteolytickou aktivitu (Phoo et al. 2016) (Kuiper et al. 2017).

Kromě těchto funkcí má NS2B i cytolytický efekt na buňky. Vero buňky transfekované plasmidem obsahujícím NS2B se 48 hodin po infekci začaly smršťovat a měnit svůj tvar (Limei Liu et al. 2010).

4.2 NS3

NS3 protein je multifunkční enzym skládající se z 618 aminokyselin. N-koncová doména má proteasovou aktivitu (ve spojení s kofaktorem NS2B), druhá, větší část enzymu zastává funkci helikasy a RTPasy (RNA-trifosfatasy)/NTPasy (nukleosid-trifosfatasy).

4.2.1 NS3pro

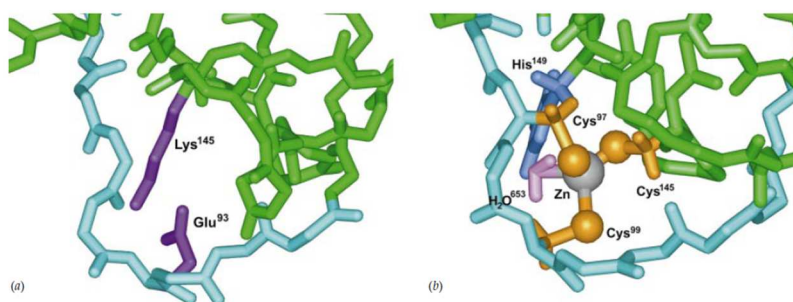
První třetinu enzymu NS3 tvoří proteasová doména skládající se ze 180 aminokyselin. Bylo zjištěno, že proteasová aktivita zůstává nezměněna při zkrácení proteinu na nejméně 167

aminokyselin. Tento enzym je ale nejvíce aktivní v komplexu s kofaktorem NS2B, zmíněném výše, tudíž tato kapitola pojednává o celém komplexu NS2B-NS3pro. Samotná NS3pro je totiž velmi rigidní, nerozpustná a dokáže jen obtížně štěpit jednoduchý chromogenní substrát *N*- α -benzoyl-L-arginine-*p*-nitroanilid. Srovnáním hodnot k_{cat}/K_m pro komplex NS2B-NS3pro a samotnou NS3pro bylo zjištěno, že při použití kofaktoru se zvyšuje účinnost štěpení až 7000krát (Yusof et al. 2000). NS3pro vykazuje větší fluktuaci zbytků, než když je v komplexu s kofaktorem. V komplexu také dochází ke zvýšení počtu hydrofobních interakcí a vodíkových vazeb. Mění se i umístění a charakter vazebného místa (Zuo et al. 2009).

4.2.1.1 Struktura NS3pro

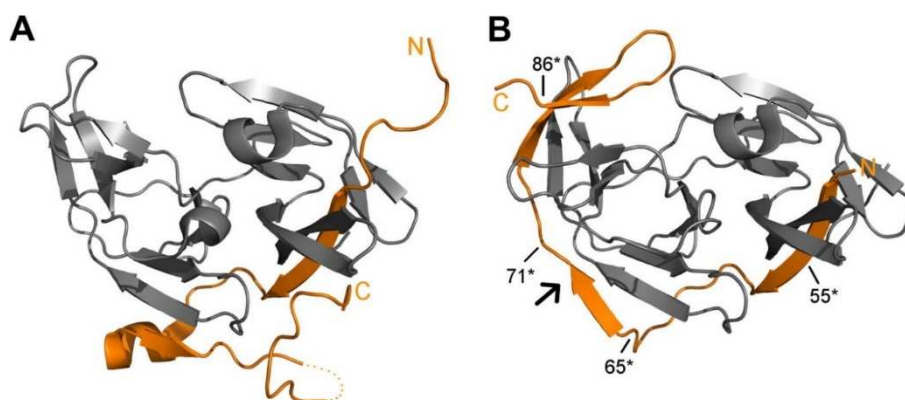
Teoretická molekulová hmotnost proteasové domény je 26,9 kDa. Skládá se ze dvou β -barelů, které jsou navzájem spojeny linkerem (obr. 8). Oba barely jsou tvořeny šesti β -listy (z angl. β -sheets). Patří do rodiny serinových proteas a její struktura je podobná struktuře chymotrypsinu (z angl. chymotrypsin-like fold). N-terminální doména 1 (aminokyseliny 31-79) se skládá z šesti β -listů a jednoho α -helixu (α_a), který se nachází mezi třetím a čtvrtým β -listem ($\beta C1$ - $\beta D1$). Stejně tam doména 2 (aminokyseliny 97-161) má stejnou skladbu (6 β -listů a α -helix (α_b) nacházející se mezi $\beta C2$ a $\beta D2$). Ostatní části NS3pro tvoří: (i) prodloužení domény 1 o dva β -listy ($\beta A0$ a $\beta D0$) a jeden α -helix (α_0) (aminokyseliny 1-30), (ii) spojení mezi doménami (aminokyseliny 80-96) a (iii) C-terminální helix α_c (aminokyseliny 162-175). Aminokyselinové zbytky, které jsou součástí katalytické triády (His, Asp, Ser) se nacházejí v různých doménách, His51, Asp75 jsou součástí domény 1, zatímco Ser135 součástí domény 2.

Většina serinových proteas využívá ke stabilizaci dvou domén v rámci celého proteinu disulfidické můstky (např. elastasa). Proteasy flavivirů jiných čeledí (například HCVpro) vyžadují vazbu zinku na čtyři ligandy (tři cysteiny a molekulu vody). Naproti tomu, enzymová aktivita DENVpro je nezávislá na použití kovů, stabilitu struktury zabezpečuje solný můstek mezi zbytky Glu⁹³ a Lys¹⁴⁵. Tento můstek je konzervován ve všech variantách Dengue proteas, nikoli však napříč flaviviry (jak už bylo řečeno rozdílným uspořádáním u HCVpro) (Brinkworth et al. 1999).



Obr. 8: Srovnání interakce dvou domén u DENV a HCV proteas. (a) Solný můstek mezi Glu a Lys zabezpečuje interakci domén v rámci NS3pro a stabilizaci struktury. (b) Stabilizaci NS3pro u HCV zabezpečuje Zn vázaný čtyřmi vazbami na tři Cys a jeden His (zprostředkovaně přes molekulu vody). Doména I je vybarvena modře a doména II zeleně. (Brinkworth et al. 1999)

Při absenci substrátu nebo inhibitoru aktivního místa je NS2B v „otevřené“ inaktivní konformaci. Jakmile dojde k navázání substrátu nebo inhibitoru, dojde ke změně konformace, NS2B „zavře“ aktivní místo a takovou konformaci nazýváme „zavřenou“ čili aktivní. Konformační změna je poměrně rozsáhlá (obr. 9). Vlášenska NS3pro (residua 117-122), nazývaná 120 smyčka, je v neaktivní konformaci velmi daleko (45 Å) od vlásenky NS2B (residua 67-95), s níž v aktivní konformaci interaguje (je vzdálená 11 Å) (Erbel et al. 2006) (Noble et al. 2012). NS3pro je asociována s membránou, i když nemá žádný hydrofobní membránový segment. Tuto asociaci zabezpečuje právě interakce s NS2B, jakožto svou druhou hlavní funkci (vedle konformačních změn a aktivace) (Falgout et al. 1991). N-terminální i C-terminální část NS3pro (aminokyseliny 14-18 a 174-185) jsou flexibilní. Jak už bylo řečeno výše, ke studiu konformačních změn se využíval komplex, jenž se skládal z kofaktoru a proteasové domény NS3, navzájem spojených linkerem (Gly₄-Ser-Gly₄). Jiné studie ale prokázaly, že stejné uzavřené a tudíž aktivní konformace může být dosaženo za použití oddělených částí proteasového komplexu (Kim et al. 2013). Tento konstrukt lépe mapuje přirozenou situaci ve viru během štěpení a po štěpení, a tak může být vhodnějším při studiu a návrhu nových inhibitorů.



Obr. 9: Konformační změny v rámci NS3pro DENV. (A) Model struktury NS2B-NS3pro v „otevřené“ konformaci (PDB kód 2FOM). N-terminální část NS2B (aminokyseliny 49-65) tvoří β -řetězec zanořující se do β -barelu NS3pro a i v „uzavřené“ (B) konformaci zůstává prakticky stejně orientovaná. C-terminální část

(aminokyseliny 66-95) prochází výraznou změnou topologie při přechodu do uzavřené konformace. (B) Model struktury NS2B-NS3pro v „uzavřené“ konformaci v komplexu s inhibitorem BPTI (PDB kód 3U1I). NS3pro vybarvena šedě, NS2B oranžově. (Chen et al. 2014)

U ZIKV dochází k dimerizaci NS2B-NS3pro, což je unikátní struktura napříč flaviviry. Dimerizace je pravděpodobně způsobena prostředím bohatým na membrány, kde dochází k lokální kumulaci těchto proteinů a následné dimerizaci (Phoo et al. 2016).

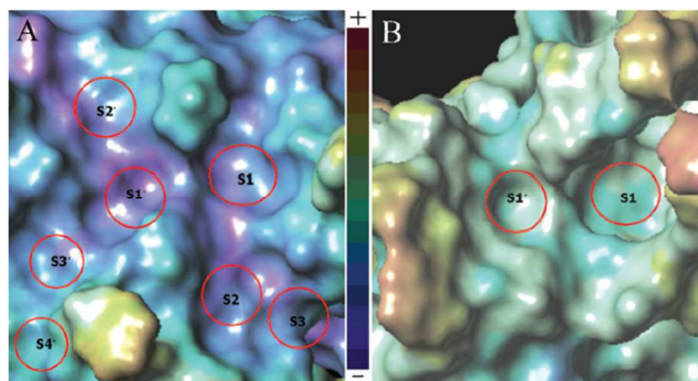
4.2.1.2 Funkce NS2B-NS3pro

Dengue i Zika proteasy patří do rodiny serinových proteas, podobných chymotrypsinu. Je zajímavé, že pouze flavivirové proteasy (na rozdíl jiných chymotrypsinu podobných proteas) vyžadují pro svou aktivitu kofaktor. Aktivní místo těchto enzymů je vysoce konzervované a skládá se z (i) katalytické triády zahrnující His51, Asp75 a Ser135 (stejně u ZIKV), (ii) oxyaniontové kavity, která stabilizuje záporný náboj rozštěpeného peptidu v tranzitním stavu a (iii) substrát vázající β -řetězce E2 a B1, které napomáhají správnému umístění substrátu v aktivním místě (Pasternak, Ringe, and Hedstrom 1999).

Katalytický mechanismus serinových proteas lze rozdělit do čtyř kroků. Jakmile dojde k navázání substrátu do aktivního místa enzymu, serin nukleofilně napadá karbonylovou skupinu peptidu, jež má být štěpena. Vzniká tzv. tetraedrální intermediát a uvolněný proton přijímá imidazolová skupina histidinu, čímž dostáváme kladně nabitý imidazoliový iont. Vodík karboxylové skupiny kyseliny asparagové je vázán na histidin. Ve druhém kroku se tetraedrální intermediát rozpadá na meziprodukt acyl-enzym díky protonu z N histidinu. Dochází k uvolnění zbytku s nově vytvořenou aminoskupinou ($R-NH_2$). Ten je nahrazen v pokračující katalýze molekulou vody. Dalším krokem je opět nukleofilní atak, tentokrát ale vody na karbonylovou skupinu navázanou na serin. Znovu dojde ke vzniku imidazoliového iontu a následně k odštěpení i C-koncové části peptidu. Posledním krokem je regenerace enzymu, k níž dochází současně s uvolňováním produktu (Voet and Voet 2005). V nejnovějších studiích zabývajících se vazebným místem proteasy bylo pomocí NMR zjištěno, že oxyaniontová kavita (z angl. oxyaniont hole), která stabilizuje záporný náboj karboxylu v tetraedrálním intermediátu, je hůře definována než v krystalografických studiích, což může ukazovat na zvýšenou dynamiku konformací v tomto úseku (Gibbs et al. 2018).

Vazba substrátu byla podrobněji zkoumána u DENV-2. Na rozdíl od chymotrypsinu a dalších jemu podobných proteas má DENV NS3pro zkrácenou smyčku mezi $\beta E1$ a Asp75 a mezi $\beta B2$ a $\beta C2$. Tyto smyčky jsou klíčové pro vazbu substrátu. Zatímco chymotrypsin rozeznává hydrofobní aminokyseliny, flavivirové proteasy štěpí za zásaditými aminokyselinami (Lys, Arg), přesněji za dvěma zásaditými aminokyselinami (Lys-Arg, Arg-Arg, Lys-Lys) následovanými aminokyselinou Gly, Ala nebo Ser (Haitao Li et al. 1999). NS2B interaguje s NS3pro $\beta 1$ barelem a této interakce se primárně účastní aminokyseliny Asp50, Glu52, and Arg55 NS2B, respektive Arg64, His60, and Glu19 NS3pro. V otevřené konformaci

(jak ji reprezentuje např. struktura pod PDB kódem 2FOM) nedochází k velkým interakcím NS2B s β -barelem 2 NS3pro. To neplatí pro uzavřenou konformaci (PDB kód 3U1I), kde naopak aminokyseliny Glu66 a Asp81 NS2B párují s Arg107 and Lys73 NS3pro a tvoří další β -list (obr. 7). Největší zásluhu na změnách konformace má tedy C-konec NS2B (Gibbs et al. 2018). Při zkoumání vazebných míst pro substrát se zjistilo, že samotná NS3pro má jen dvě vazebné dutiny (z angl. pockets) pro substrát, kdežto v přítomnosti kofaktoru se jich díky konformačním změnám vytvoří dalších pět (obr. 10) (Zuo et al. 2009).



Obr. 10: Mapa povrchu NS2B-NS3pro (A) a NS3pro (B) a vazebných míst pro substrát. Vazebné dutiny jsou vyznačeny v červených kruzích. Barevná škála mezi dvěma obrázky vyjadřuje charakter nabitých aminokyselin, jejichž residua tvoří povrch enzymu. (Zuo et al. 2009)

Inhibitory blízce příbuzné proteasy HCV (taktéž čeled' *Flaviviridae*) se klinicky používají v léčbě žloutenky typu C. Jedná se například o simeprevir (Raboisson et al. 2008), glecaprevir (Lawitz et al. 2016) či grazoprevir (Summa et al. 2012). Tyto inhibitory by tedy mohly být inspirací pro vývoj inhibitorů ZIKV a DENV.

Proč se vlastně vyskytuje flavivirová proteasa jako dvoukomponentová? Ukázalo se, že NS3pro bez přítomnosti kofaktoru váže syntasu mastných kyselin (z angl. fatty acyl synthase), čímž spouští procesy vedoucí k remodelaci membrány. Pokud je v komplexu s kofaktorem, nemá téměř žádnou afinitu k této syntase (Gupta, Lim, and Song 2015).

Kromě hlavní funkce má NS2B-NS3pro ještě roli v obraně proti imunitnímu systému a to tu, že štěpí aktivátor interferonové odpovědi STING (Phoo et al. 2016).

4.2.2 NS3hel

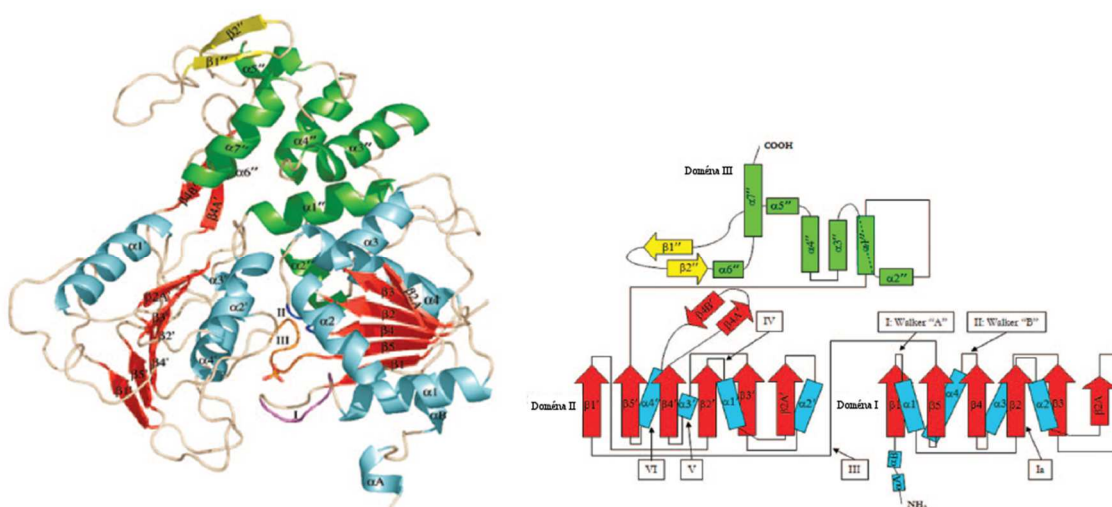
Druhá a větší část proteinu NS3 zahrnuje aminokyseliny 180-618 a vykazuje helikasovou RTPasovou a NTPasovou aktivitu. Helikasa je nezbytnou součástí procesu replikace virové RNA, protože slouží k rozplétání dvou komplementárních řetězců RNA od sebe. V procesu replikace totiž dochází jak k tvorbě dvouřetězců RNA (tzv. replikativní formy – RFs, z angl. replicative forms), tak k tvorbě RNA jednořetězcových molekul (tzv. replikativní meziproducty – RIs, z angl. replicative intermediates). Helikasa však ke správnému rozpletení dvouřetězce vyžaduje energii ve formě ATP (nebo NTP), kterou získává jeho hydrolýzou, a tudíž je součástí

NS3 proteinu i NTPasa, jež zajišťuje tento proces.

4.2.2.1 Struktura NS3hel (obr. 11)

V předchozím oddíle jsem naznačila, že helikasová část proteinu NS3 začíná až od aminokyseliny 180, ale u DENV bylo zjištěno, že delece 180 aminokyselin od N' konce vedla ke značnému ovlivnění funkce NTPasy. Předpokládalo se tedy, že aminokyseliny 160-180 jsou nezbytné současně pro proteasu i helikasu/NTPasu (H Li et al. 1999). Mezi proteasou a helikasu se nachází spoj (aminokyseliny 169-179), který tvoří dvě smyčky obklopující vazebné místo helikasy pro ATP (Luo et al. 2008).

Helikasa obsahuje dva hlavní motivy, Walker A a Walker B, které jsou konzervované napříč proteiny vázajícími nukleotidy či nukleové kyseliny. Helikasy obecně můžeme podle dalších motivů rozdělit do tří superrodin podle (Gorbalenya and Koonin 1993). DENV helikasa patří do superrodiny 2 (z angl. SF2 – superfamily 2) spolu s dalšími flavivirovými NTPasami/RNA-helikasami. Základ proteinu tvoří opakující se tandemová struktura α/β , jejíž aminokyseliny interagují s nukleotidy substrátu a s Mg^{2+} ionty (obr. 11). Bylo zjištěno, že i jiné ionty dokáží plnit funkci Mg^{2+} iontů, ale že dvojmocné kationty jsou nezbytné pro funkci helikasy (Cao et al. 2016) (Luo et al. 2008).

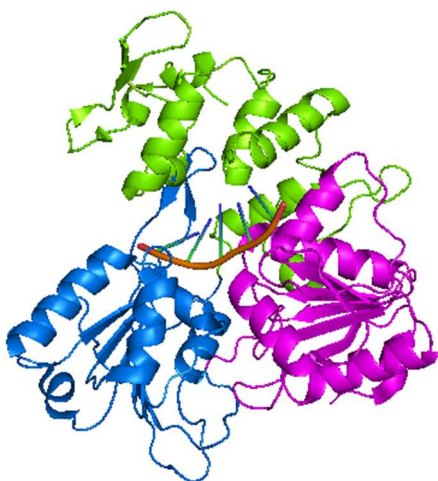


Obr. 11: Model NS3hel DENV (aminokyseliny 171-618). Barevné označení sekundárních struktur v modelu odpovídá barevnému značení v diagramu vpravo. Jednotlivé motivy v rámci domén jsou značeny římskými číslicemi. (převzato a upraveno dle Xu et al. 2005)

NS3hel má tři strukturní domény, každá se skládá z asi 150 aminokyselin. Doména I (aa 180-326) a doména II (aa 327-481) jsou strukturně velmi podobné, i když vykazují malou sekvenční identitu. Skládají se z šesti paralelních β -řetězců (z angl. β -strand) obklopených čtyřmi α -helixy (obr. 9). Doména III je odlišná od ostatních dvou a tvoří ji hlavně α -helixy. Čtyři delší paralelní helixy tvoří svazek obklopený třemi kratšími helixy a dva antiparalelní β -řetězce rozšiřují celou tuto strukturu (obr. 11). Domény spolu interagují pomocí dlouhé β vlásenky (z angl. β -hairpin), která vychází z domény II a zanořuje se do domény III a dále

pomocí dvou helixů z domény III a jednoho helixu z domény I. Doména III má jedinečnou strukturu (z angl. fold), která v rámci helikasy nemá obdoby.

Všechny tři domény se svými aminokyselinami podílejí na formování tunelu (z angl. tunnel), jenž slouží k vazbě nukleotidového substrátu o délce maximálně šesti nukleotidů (obr. 12). Tunel je dostatečně velký pro ssRNA, nikoli však pro dsRNA. Jedna strana tunelu je lemována kladně nabitými a zásaditými aminokyselinami, zatímco druhá část spíše záporně nabitými aminokyselinami. Tato elektrostatická repulze pohání helikasu po substrátu a také zabráňuje znovuvytvoření dvojvlákna (Xu et al. 2005). Součástí NS3hel je také P-smyčka (z angl. P-loop) vázající fosfát. Samotná helikasová doména (bez proteasy) má asi 30x nižší aktivitu než helikasa v rámci celého NS3 proteinu. To poukazuje na nezbytnost proteasy, jež stimuluje chemickou energii potřebnou pro rozvinutí dvouřetězce RNA (Xu et al. 2005).



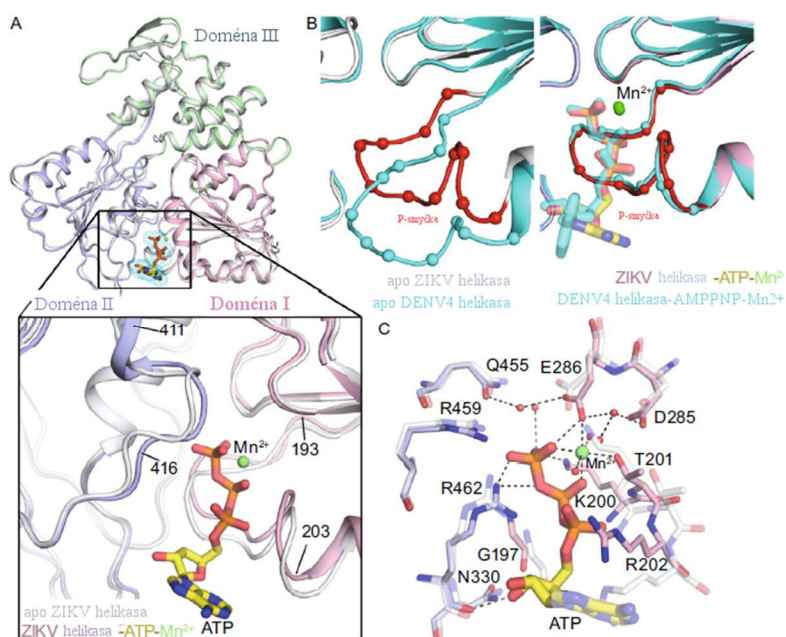
Obr. 12: Struktura ZIKV helikasy zobrazující pozice tří domén a RNA substrát. Potenciální místo pro vazbu NTP a Mg^{2+} se nachází na rozhraní domény I a II. Doména I je vybarvena růžově, doména II modře a doména III zeleně. Struktura (PDB kód 5GJB) byla vytvořena v programu PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC).

Některé krystalové struktury naznačovaly oligomerizaci NS3hel, nejspíš kvůli možnosti vázat se na více míst řetězce a snáze se přemístit mezi vlákna RNA. To může potvrdit i experiment, při němž se NS3hel vyskytoval v absenci nukleové kyseliny jako monomer (Xu et al. 2005).

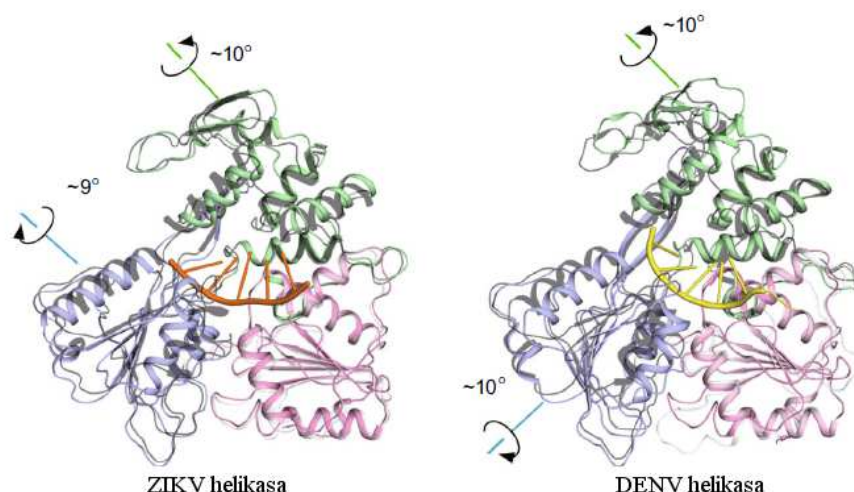
Struktura helikasy ZIKV je trochu odlišná. Domény jsou v základu stejně rozdělené, ale s následujícími odlišnostmi (obr. 13, 14). Doména I (aa 182-327) obsahuje typické motivy I/P-smyčka (jinak nazývaný Walker A), Ia, II (Walker B) a III, doména II (aa 328-480) motivy IV, IVa, V a VI. ATP se váže do prostoru mezi doménou I a II, zatímco RNA prochází tunelem oddělujícím domény I a II od domény III. β -vlásenka, která je prodloužením domény II a interaguje s doménou III, jak tomu bylo i u DENV, je mnohem kratší než právě u dengue helikasy (aminokyseliny 431-444). Existují zde i rozdíly v elektrostatických interakcích na povrchu enzymu. Vazebný žlábek je u ZIKV méně bazický než u jiných flavivirů. Dále vykazuje tato helikasa větší flexibilitu v orientaci domén I a II a taktéž i v konformaci smyček

podílejících se na vazbě ATP a RNA. Ve srovnání s DENV je vazebné místo pro ATP širší (u ZIKV) a celkově apo helikasy zaujímá částečně „otevřenou“ konformaci (jako ji můžeme nalézt i u WNV, YFV a JEV). DENV-2 i DENV-4 vykazují naopak „uzavřenou“ konformaci (Xu et al. 2005). P-smyčka (196-203) i RNA-vázací smyčka (244-255) mají u ZIKV i DENV stejnou konformaci a jsou to ty nejvíce flexibilní struktury v rámci helikasy (Xu et al. 2005). NTP vazací místo je lokalizováno mezi doménami I a II a hlavní roli v rozpoznávání NTP a Mg^{2+} nebo Mn^{2+} iontů hrají výše zmíněné motivy Walker A a B. Při superimpozici a srovnání hlavních motivů domén I a II ZIKV a DENV-4 se zjistilo, že jsou si velmi blízko. Motiv I (ZIKV – aminokyseliny Lys200, Thr201, Arg202; DENV – aminokyseliny Lys199, Thr200, Arg201), motiv II (ZIKV Asp285, Glu286; DENV-4 Asp284, Glu285) a motiv IV (Gln455, Arg459 a Arg462; DENV-4 Gln456, Arg460 a Arg463) hrají stejnou roli v hydrolýze NTP u obou virů (Tian, Ji, Yang, Xie, et al. 2016). Struktura apo formy se výrazně neliší od formy s navázaným ATP a Mn^{2+} (hořečnaté či manganaté ionty jsou esenciální pro fungování helikasy).

Obecně se apo helikasy ZIKV a DENV liší, ale pokud srovnáváme helikasy v komplexu s Mn^{2+}/Mg^{2+} a ATP/AMPPMP (nukleotidový analog 5'-adenylyl- β , γ -imidodiphosphate), vykazují prakticky totožnou strukturu (obr. 13B) (Luo et al. 2008) (Tian, Ji, Yang, Zhang, et al. 2016). Mn^{2+} se váže oktahedrálně do kavity přes zbytky Glu286, Thr201, dvě uspořádané molekuly vody a dva atomy kyslíku (z fosfátových skupin NTP). ATP interaguje se zbytky Gly197, Lys200, Arg202, Arg459 a Arg462 (obr. 13C). I po navázání RNA do komplexu dochází ke konformačním změnám, jež jsou naznačeny v obr. 14, týká se to hlavně konformačních změn v rámci vazebné smyčky pro RNA (Mottin et al. 2017).



Obr. 13: Struktura ZIKV NS3hel v komplexu s ATP/ Mn^{2+} . (A) Terciární struktura a topologie tří domén v rámci helikasy. Na výřezu je bíle vybarvena apo forma enzymu, barevně pak posun domén při navázání ATP a Mn^{2+} . ATP reprezentuje tyčkovitý model a Mn^{2+} je vyznačen jako zelená koule. (B) Detail P-smyčky pro ZIKV a DENV. Apo formy jsou na obrázku více vlevo. ZIKV struktura vybarvena bíle, P-smyčka červeně; DENV struktura je tyrkysová. Na obrázku vpravo je naznačen posun smyčky, nyní kopírují obě struktury takřka stejný fold. (C) Interakce v NTP vazebném místě po navázání Mn^{2+} . Apo forma zobrazena v průsvitných barvách. Naznačeny jsou i interakce manganatého kationtu s jednotlivými residuy. PDB kód apo formy enzymu je 5JMT. (převzato a upraveno dle Tian, Ji, Yang, Zhang, et al. 2016)



Obr. 14: Struktura ZIKV a DENV helikasy v komplexu s RNA. Apo formy v obou enzymech vyznačeny šedě, stupně naznačují posun domén po vazbě RNA substrátu (oranžově a žlutě). (převzato a upraveno dle Tian, Ji, Yang, Zhang, et al. 2016)

4.2.2.2 Funkce NS3hel a NTPasy

K procesu replikace RNA je zapotřebí i NTPasová aktivita enzymu, tzn. vazba a hydrolýza NTP. Je zajímavé, že pokud byla při studiu helikasové aktivity použita jako substrát dsDNA místo ssRNA, došlo ke zvýšené aktivitě helikasy (Luo et al. 2008). Pro správné vázání ssRNA do tunelu jsou nezbytné molekuly vody, protože hrají důležitou roli v rozpoznávání jednotlivých nukleotidů (Tian, Ji, Yang, Zhang, et al. 2016). Vazba NTP (jako alosterický aktivátor helikasy) a hydrolýza NTP (jako substrát) jsou samostatné procesy a oba jsou nezbytné pro funkci helikasy (Cao et al. 2016).

4.3 Role NS4B

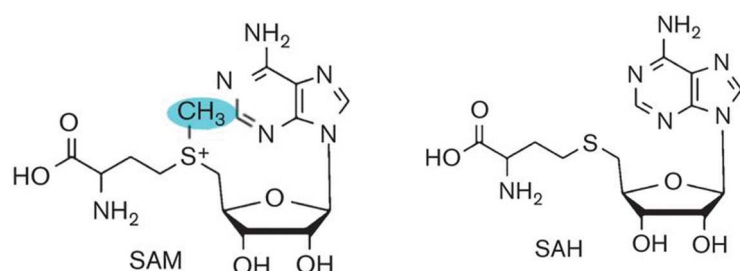
Jak již bylo napsáno výše, NS4B protein stimuluje helikasovou aktivitu NS3 *in vitro* i *in vivo*. Strukturně tento protein tvoří dva N-terminální amfipatické helixy, tři transmembránové helixy a cytoplasmatická smyčka (Miller, Sparacio, and Bartenschlager 2006). Bylo zjištěno, že NS4B interaguje s NS3 jak v infikovaných buňkách (Jing Zou, Lee, et al. 2015), tak v buňkách kotransfekovaných plasmidy nesoucími zvláště NS3hel a NS4B (Chatel-Chaix et al. 2015). Interakce probíhá mezi doménou 2 a 3 NS3hel a mezi C-terminální částí cytoplasmatické smyčky (Jing Zou, Lee, et al. 2015) Tato smyčka nejen že stimuluje helikasovou aktivitu, ale také přispívá k oligomerizaci NS4B (J. Zou et al. 2014). Cytoplasmatická smyčka a hlavně aminokyselina Q134 jsou esenciální pro interakci s NS3hel a hlavně pro replikaci DENV (Chatel-Chaix et al. 2015).

4.4 NS5

Nestrukturní protein 5 je největším (102kDa) a nejvíce konzervovaným enzymem napříč flaviviry. Skládá se ze dvou domén, N-terminální část proteinu se nazývá methyltransferasa (MTasa), která je zodpovědná za syntézu methylguanosinové čepičky (z angl. cap) na virovou RNA. Kromě toho vykazuje i guanylyltransferasovou a N7 a 2'O ribosa methylační aktivitu. C-terminální doména slouží jako RNA-dependentní-RNA polymeráza (RdRP) a je tedy nezbytná pro replikaci RNA. NS5 velmi úzce spolupracuje s NS3 proteinem, hlavně s helikasovou doménou, která má kromě helikasové aktivity také RTPasovou aktivitu (RNA trifosfatasovou), jež zahajuje syntézu RNA čepičky odstraněním třetí fosfátové skupiny z 5' trifosfát-mRNA.

4.4.1 Methyltransferasa

Methyltransferasová doména zahrnuje aminokyseliny 1-265 a její hlavní funkcí je syntéza mRNA čepičky. Tvorba čepičky je nezbytnou součástí infekce, protože virus díky ní může uniknout imunitní reakci buňky (eukaryotické mRNA mají stejné čepičky) (Chang et al. 2016). Donorem methylové skupiny je SAM (*S*-adenosyl-L-methionin) a produktem této reakce je SAH (*S*-adenosylhomocystein) (obr. 15)

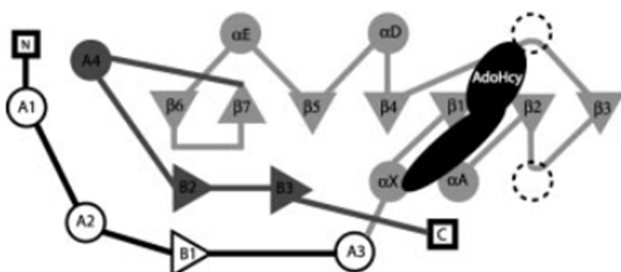


Obr. 15: *S*-adenosyl-L-methionin (SAM) a *S*-adenosylhomocystein. Methylová skupina vyznačená modře je použita k methylaci (Dong et al. 2014)

4.4.1.1 Struktura methyltransferasy

Flavivirové MTasy mají všechny velmi podobnou strukturu: N-terminální část (aa 7-54), základ proteinu, který zaujímá strukturu typickou pro všechny SAM-vázající MTasy (aa 55-222) a C-terminální část (aa 223-265). N-terminální subdoména obsahuje typický motiv helix-otočka-helix (z angl. helix-turn-helix), za kterým pokračuje β -řetězec a ještě jeden helix. C-konec MTasy tvoří α -helix, následovaný dvěma β -řetězci. Tato subdoména se nachází mezi prvními zmíněnými subdoménami (Egloff et al. 2002). Základ proteinu zaujímá typickou Rossmann strukturu – sedm β -řetězců obklopených z každé strany dvěma α -helixy (obr. 16). Dále obsahuje také vazebné místo pro SAM, GTP a RNA-vazebné místo. Tato doména je strukturně velmi konzervovaná napříč SAM-dependentními MTasami, i když je sekvenční identita těchto enzymů nízká.

SAM-vazebné místo je doplněno o kavitu, která váže adenin SAM. Tato kavita se sice nachází ve všech flavivirových MTasách (např WNV - (Zhou et al. 2007), DENV - (Egloff et al. 2002)), ale chybí u jiných MTas tohoto typu (Lihui Liu et al. 2010). Vnitřní povrch kavity je vyplněn převážně hydrofobními aminokyselinami (Thr104, Lys105, Val132, Ile147 u DENV) (Egloff et al. 2002).



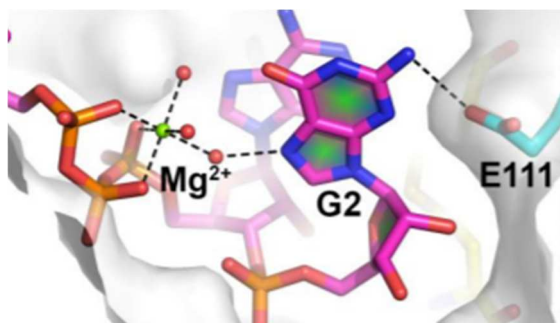
Obr. 16: Diagram pravděpodobné topologie subdomén v rámci MTasy. Čtverce reprezentují N- a C-konec proteinu. Helixy jsou značeny kruhy a β -řetězce trojúhelníky. Šedě jsou vyznačeny části proteinu, které zaujímají typickou strukturu SAM-vázajících methyltransferas. Čárkované kruhy naznačují místa, která jsou v rámci struktury vyplněna jinými částmi NS5 proteinu. S-adenosyl-homocystein je vyjádřen jako černá struktura v rámci MTasy. (Egloff et al. 2002)

Při vazbě GTP se zapojuje aminokyselina Phe25 (u ZIKV Phe24 (C. Zhang et al. 2017)), která svým aromatickým jádrem interaguje s guaninem pomocí takzvané „stacking“ interakce. Smyčka propojující $\beta 4$ -řetězec s αD helixem je důležitá pro fixaci GTP, aminokyseliny Ser150 a Pro152, jež jsou součástí smyčky, interagují s α -fosfátem GTP. Ribosa GTP se vyskytuje v 3'-endo konfiguraci a hydroxylová skupina (2'-OH) je stabilizována postranními řetězci aminokyselin Lys14 a Asn18. Co se týče specifity GTP-vazebného místa pro guanin, bylo zjištěno, že není možná vazba jiné báze kvůli interakci 2-amino skupiny guaninu s karbonylovými skupinami hlavního řetězce ve vazebné kavitě. Zajímavé také je, že MTasa váže jak methylované, tak nemethylované GTP. (Egloff et al. 2002). Vazebné místo pro GTP je u ZIKV podobně konzervované, jen má více hydrofobní charakter než u DENV (Coloma et al. 2016).

Další strukturně důležité místo je vazebné místo pro RNA. To zabírá podstatnou část bazicky nabitě části proteinu. RNA se váže 5' koncem přes stohovací (z angl. stacking) interakci guaninu (z m^7G čepičky) s Phe25, na druhé straně interaguje s SAM-vazebnou kavitou. Zbytek RNA substrátu použitého při této studii zaujímá α -helikální konformaci a zahýbá se do tvaru písmene „L“. Jako substrát byl použit RNA úsek, který má sekvenci 5' $m^7G_{0ppp}A_1G_2$, což je pořadí bazí, které je konzervováno napříč RNA všech flavivirů. Mutagenezí bylo zjištěno, že postranní řetězec Glu111 je nezbytný pro replikaci RNA, protože polárně interaguje s druhou nukleovou bazí v řetězci RNA (G_2). Tato interakce probíhá přes vodíkovou vazbou

karboxylové skupiny Glu, N2 atom guaninu a molekulu vody, přes níž je koordinálně kovaletní vazbou připojen kationt Mg^{2+} (obr. 17). (Y. Zhao et al. 2015).

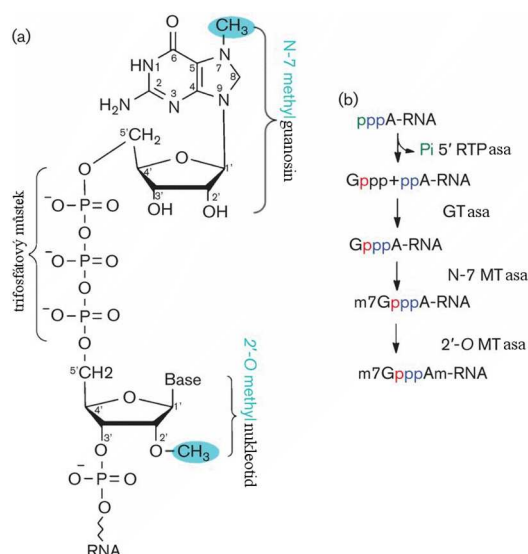
Za přenos methylové skupiny je zodpovědná katalytická tetřáda K-D-K-E, jejíž mechanismus bude ještě podrobněji zmíněn níže.



Obr. 17: Pozice guaninu (G_2) při interakci s Glu111 a s hořečnatým kationtem. (Y. Zhao et al. 2015)

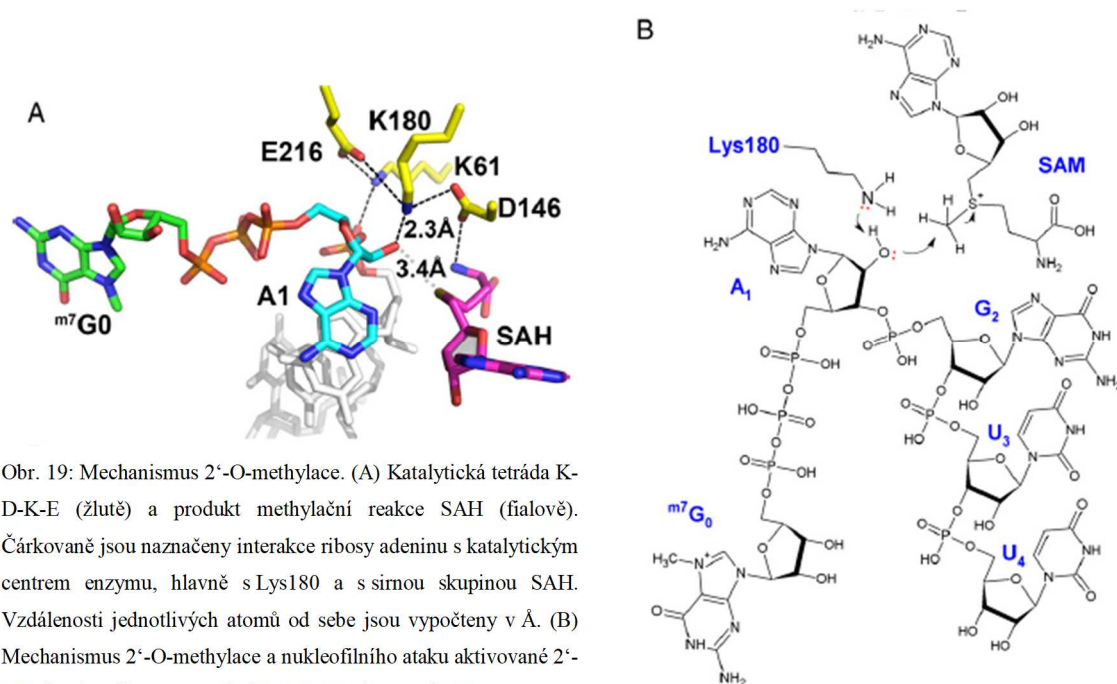
4.4.1.2 Funkce

MTasa virů Zika a Dengue má tři odlišné enzymové aktivity. Zaprvé je to guanylyltransferasová aktivita, dále N7 MTasová a 2'-O MTasová aktivita. Hlavní funkcí MTasy je tvorba methylguanositové čepičky (obr. 18a). Tento proces probíhá v několika krocích: Nejprve je potřeba odstranit γ -fosfát z 5' konce mRNA trifosfátu. Po této reakci, kterou zprostředkovává C-terminální část NS3 proteinu, RTPasa, zůstává na 5' konci difosfát. Druhou reakci zprostředkovává již NS5 protein, přesněji řečeno GTasa, která je součástí N-terminální části proteinu. Dochází zde k přenosu GMP z GTP na difosfát mRNA. Po tomto kroku má 5' konec nukleové kyseliny podobu G_{0ppp} -AG-RNA (AG jsou první dva konzervované nukleotidy na počátku každé flavivirové mRNA – viz výše). Při poslední reakci se využívá SAM jako donor methylové skupiny. V prvním methylačním kroku guanin-N7-methyltransferasa (N7-MTasa) přenáší methyl na guanosin přenesený ve druhém kroku. Dochází tak k tvorbě tzv. „čepičky 0“ (z angl. cap 0): m^7G_{0ppp} -AG-RNA. Druhý methylační krok je katalyzován ribosa-2'-O-methyltransferasou (2'-O-MTasou), tvoří se „čepička 1“ (z angl. cap 1): m^7G_{0ppp} -A $m^{2'-O}$ -G-RNA (Stage et al. 2000) (obr. 18b). GTasa flavivirů katalyzuje dvě enzymatické reakce. Tvorbu GMP-enzym intermediátu a následně i přenos GMP na RNA. V prvním kroku dochází k nukleofilnímu útoku α -fosfátu GTP enzymem. GMP je kovalentně propojeno fosfoamidovou vazbou k Lys29, který zahajoval atak a je tedy nezbytný pro tuto reakci, což bylo dokázáno i mutagenézí (Issur et al. 2009).



Obr. 18: (a) Struktura čepičky na 5' konci mRNA. Methylové zbytky připojené MTasami jsou vyznačeny modře. (b) Mechanismus tvorby čepičky a methylace (převzato a upraveno dle Dong et al. 2014)

Zbytky Lys61, Asp146, Lys180 a Glu216 (DENV číslování (Y. Zhao et al. 2015)), které tvoří katalytickou tetrádu aktivního místa enzymu, jsou nejbližší 2'-OH skupině a přispívají k její deprotonaci a následně i k nukleofilnímu útoku na uhlík methylové skupiny SAM (Egloff et al. 2002). Mechanismus 2'-O-methylace probíhá následovně: RNA je stabilizována v aktivním místě MTasy a ribosa prvního nukleotidu adeninu se nachází v těsné blízkosti donoru methylové skupiny. Lys180 aktivuje 2'-OH skupinu ribosy a takto aktivovaná hydroxylová skupina nukleofilně atakuje methylovou skupinu SAM a přenáší ji na ribosu (obr. 19) (Y. Zhao et al. 2015).



Obr. 19: Mechanismus 2'-O-methylace. (A) Katalytická tetráda K-D-K-E (žlutě) a produkt methylační reakce SAH (fialově). Čárkovane jsou naznačeny interakce ribosy adeninu s katalytickým centrem enzymu, hlavně s Lys180 a s sirmou skupinou SAH. Vzdálenosti jednotlivých atomů od sebe jsou vypočteny v Å. (B) Mechanismus 2'-O-methylace a nukleofilního útoku aktivované 2'-OH skupiny ribosy na methyl SAM. (Y. Zhao et al. 2015)

4.4.2 RNA-dependentní-RNA-polymerasa

RNA-dependentní-RNA-polymerasa (RdRP) hraje významnou roli při replikaci genomu virů. Interaguje s NS3 proteinem a kromě funkce polymerasy se podílí i na snižování exprese proteinu STAT2 a tím potlačuje imunitní odpověď hostitelských buněk kvůli zablokování interferonové signalizační dráhy (Munoz-Jordan et al. 2003) (Ashour et al. 2009). K dalším funkcím RdRP patří její schopnost pronikat do jader hostitelských buněk a interagovat s transkripčními faktory (Khunchai et al. 2015) (Khunchai et al. 2012).

4.4.2.1 Struktura RdRP

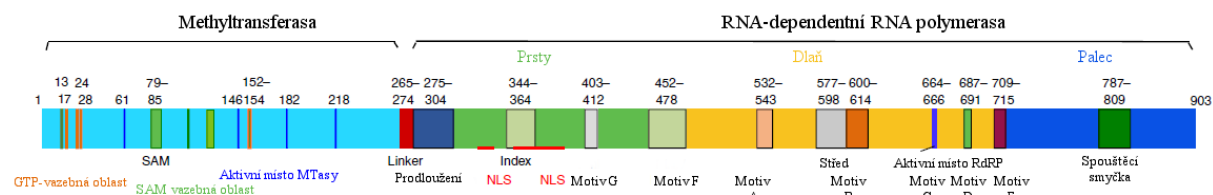
Polymerasa tvoří větší část NS5 proteinu (aminokyseliny 265-700) a zaujímá strukturu tvaru pravé ruky, jako všechny známé polymerasy. Tvoří ji dlaň, palec a prsty (z angl. palm, thumb, fingers) a oproti jiným polymerasám má ještě část představující jaderný lokalizační signál (NLS – z angl. nuclear localization signal), který hraje kromě jiného roli v zaujetí správné konformace proteinu – při studiích se zkrácenou NLS doménou došlo k destabilizaci proteinu a ke snížení exprese tohoto produktu (Yap et al. 2007). NLS se nachází mezi „palcovou“ a „prstovou“ doménou, přesněji jde o helixy $\alpha 2$ a $\alpha 3$, které tvoří helix-otočka-helix motiv (z angl. helix-turn-helix), a helixy $\alpha 6$ a $\alpha 7$ (Duan et al. 2017). Oblast jaderného lokalizačního signálu se skládá z β NLS (aminokyseliny 316-368) a α/β NLS (aminokyseliny 369-415) sekvencí (DENV-3 číslování) (Yap et al. 2007). Bylo zjištěno, že β NLS interaguje s helikasovou doménou NS3 přes velmi konzervovanou sekvenci dvaceti aminokyselin. Ten stejný úsek váže β -importin při transportu polymerasy do jádra. NS3 tedy soutěží s importinem o vazbu na tutéž sekvenci (Johansson et al. 2001).

Co se týče sekundárních struktur (obr. 20), RdRP obsahuje celkem 27 helixů (helix $\alpha 3$ je ve skutečnosti 3_{10} helix) a 7 β -řetězců. Prstová doména zahrnuje aminokyseliny 273-315, 416-496 a 543-600 (číslování DENV-3). Je pravděpodobné, že povrch v blízkosti „báze“ prstů je zodpovědný za ukotvení N-konce MTasy (Yap et al. 2007). Celá tato doména je výrazně flexibilnější, než ostatní dvě (palec a ruka), což bylo mimo jiné dokázáno strukturním porovnáváním flavivirových polymeras. Oblast „prstů“ vykazovala nejmenší podobnost ze všech výše zmíněných domén (Yap et al. 2007). Ačkoli je sekvenční identita nízká, vyskytují se zde v rámci struktury dva konzervované motivy. Motiv F stabilizuje nově vznikající vazbu mezi dvěma bázemi (Yap et al. 2007) a motiv G slouží jako kontrolní bod pro pohyb templátu během translokace.

Dlaň polymerasy tvoří dva antiparalelní β -listy a osm α -helixů. Struktura dlaně je nejvíce konzervovanou napříč flaviviry, obsahuje čtyři z šesti motivů zodpovědných za vazbu NTP a katalytickou aktivitu. Motiv A spolu s motivem C váží Mg^{2+} , což je esenciální iont

potřebný pro polymeraci řetězce. Dvojmocné ionty jsou vázány koordinačně kovaletní vazbou mezi zbytky asparagových kyselin, jež jsou součástí těchto motivů (B. Zhao et al. 2017). Motiv B napomáhá „sklouznutí“ (z angl. sliding) templátu do katalytického místa (Shu and Gong 2017). Motiv C, GDD (Gly, Asp, Asp) katalytické aktivní místo RdRP se nachází mezi β -řetězci 4 a 5, jež jsou součástí „dlaně“ (Yap et al. 2007). Role motivu D není zatím zcela známá, ale předpokládá se, že hraje roli ve specifickém rozpoznávání nukleotidů přicházejících do aktivního místa (Canard et al. 1999). Na rozhraní dlaně a palce se nachází motiv E, jenž hraje roli ve vazbě zinku (viz níže).

Palcová doména tvoří C-koncovou část RdRP a obsahuje dva konzervované motivy. Motiv E tvoří antiparalelní β -list, který se nachází mezi palcovou a dlaňovou doménou. V blízkosti tohoto motivu se nacházejí dvě vazebné dutiny pro zinek. První z nich je vázán čtyřnásobnou koordinačně kovaletní vazbou k aminokyselinovým zbytkům His712, His714, Cys728 v rámci motivu E a k Cys847 helixu α 26 (k molekule vody v případě ZIKV (Duan et al. 2017)). Vazebné místo pro druhý zinek se nachází v prstové doméně a je koordinován aminokyselinovými zbytky Cys446, Cys449, His441 a Glu437. Spouštěcí smyčka (z angl. priming loop), což je druhý motiv, slouží jako primer pro iniciaci polymerace. Kontakt mezi prstovou a palcovou doménou zprostředkovávají struktury, anglicky nazývané „fingertips“, které stabilizují strukturu a díky své flexibilitě přizpůsobují polymerasu konformačním změnám (Yap et al. 2007).

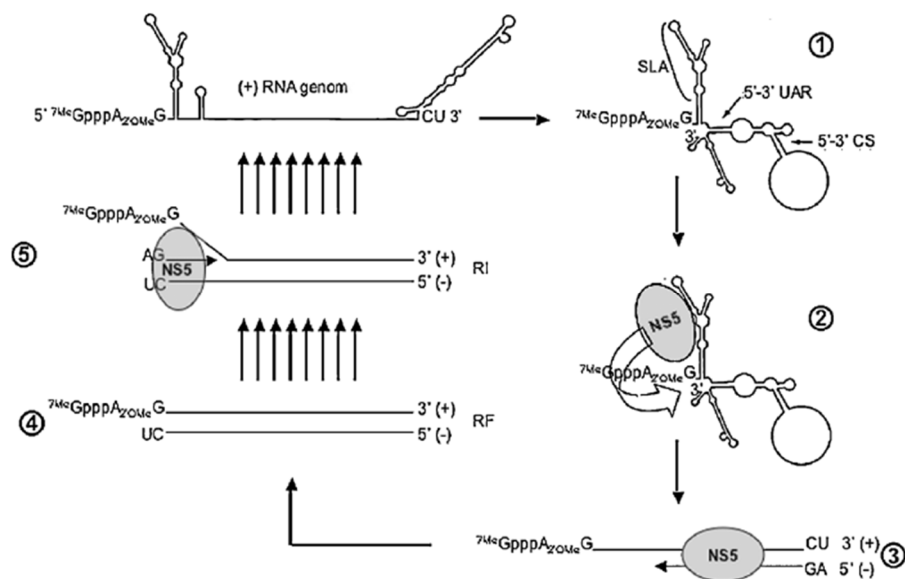


Obr. 20: Schematické znázornění NS5 proteinu a aminokyselinových pozic tvořících důležité motivy. (převzato a upraveno dle B. Zhao et al. 2017)

Při srovnání struktur RdRPs ZIKV a DENV bylo zjištěno, že sekvenční identita těchto dvou proteinů je 66% a relativní orientace MTasové a polymerasové domény je velmi odlišná. DENV zaujímá mnohem kompaktnější konformaci než ZIKV. Další odlišnost je vidět v rámci F a G motivu v prstové doméně, u ZIKV jsou tyto motivy stabilizovány díky silným interakcím s MTasovou doménou, ale u DENV jsou více neuspořádané, protože tato blízká interakce zde chybí (Duan et al. 2017). Je ale zvláštní, že při celkem vysoké sekvenční podobnosti mají tyto enzymy tak rozdílné konformace. Zdá se, že DENV může v roztoku zaujímat dvě odlišné konformace, funkčně na sobě nezávislé (Bussetta and Choi 2013).

4.4.2.2 Funkce RdRP

RNA polymerasa je esenciální enzym pro replikaci flavivirů. K iniciaci replikace není potřeba žádný primer, protože genom flavivirů obsahuje komplementární sekvence (CS – z angl. complementary sequence) na 5' a 3' konci. CS na 5' konci je součástí N-konce kapsidového proteinu, na 3' konci se nachází uvnitř nepřekládané oblasti (UTR – z angl. untranslated region) (Hahn et al. 1987). Takzvaná *de novo* iniciace probíhá následovně (obr. 21):

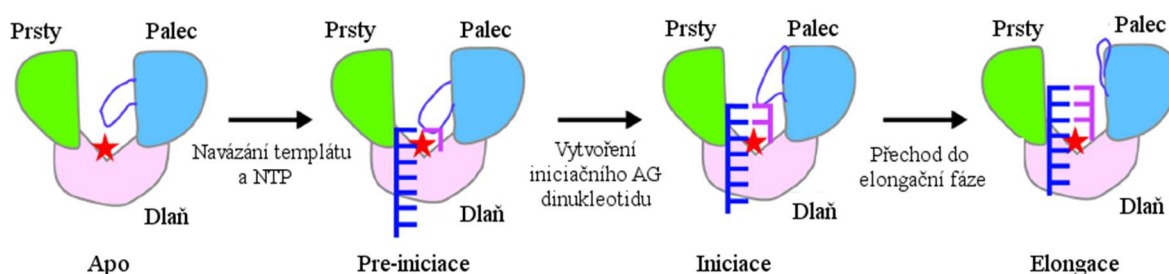


Obr. 21: Mechanismus replikace RNA flavivirů. (převzato a upraveno dle Malet et al. 2008)

1. Po syntéze čepičky dochází k cirkularizaci RNA díky komplementárním sekvencím. UAR je název pro sekvenci „nad kodonem AUG“ (z angl. Upstream of AUG Region).
2. RdRP se váže na promotor smyčky A (SLA – z angl. stem loop A) a využívá 3' konec jako templát. Dvě přichodící báze, ATP a GTP se vážou vodíkovými vazbami na základě Watson-Crickova párování ke komplementárním bazím U a C na 3' konci. Spouštěcí smyčka uzavírá výstup z RNA-vázacího tunelu a poskytuje tak dostatek času k nukleofilnímu útoku 2'-OH skupiny adeninu na α -fosfát guaninu. Takto je vytvořen první fosfodiesterová vazba (Yap et al. 2007). Ve stabilizaci fosfátové skupiny hrají roli zbytky Arg729 a Arg737.
3. Po vytvoření primeru se dsRNA posouvá do místa výstupu tunelu, aby byl k dispozici prostor pro nově přichodící NTPs. Takto je syntetizováno dvouvlákno.
4. Replikativní forma (RF) slouží jako templát pro nově syntetizované vlákno.
5. syntézu nového +ssRNA vlákna můžeme v komplexu s dsRNA označit jako replikativní intermediát (RI).

Obecně se polymerasa nachází ve třech konformačních stavech (Ackermann and Padmanabhan 2001) (obr. 22). V „uzavřeném“ stavu, který je pozorovatelný ve většině

krystalických struktur (Yap et al. 2007) (Duan et al. 2017), vstupují do aktivního místa nukleotidy, ale RNA východový tunel (z angl. exit tunnel) je uzavřen. Tato fáze je nazývána preiniciační, spouštěcí smyčka je v prodloužené konformaci. Druhá, iniciační fáze, již byla popsána v bodu č. 2 výše, spouštěcí smyčka stabilizuje celou strukturu. Poslední konformační stadium, kdy se polymerasa nachází v „otevřeném“ stavu, umožňuje výstup dvouvlákna z výstupního tunelu polymerasy. Spouštěcí smyčka se vrací do původní konformace a již dále neuzavírá výstupní místo. Tato elongační fáze je limitující krok polymerázové aktivity, protože během ní dochází k největším konformačním změnám.



Obr. 22: Konformační změny v rámci polymerasy během replikace. Modré vlákno reprezentuje spouštěcí smyčku a její funkci v rámci RdRP. Dlaňová doména (krémová) obsahuje aktivní místo polymerasy označené červenou hvězdou. Prstová doména označena zeleně, palcová doména modře. (převzato a upraveno dle Wang et al. 2018)

Jak již bylo řečeno v kapitole o struktuře, součástí polymerasové domény jsou dva jaderné lokalizační signály. Dřívější studie navrhovaly, že právě tyto NLS jsou zodpovědné za vazbu importinu a transport do jádra. Nedávno se však zjistilo, že tuto funkci má nejspíše 18 C-koncových aminokyselin, které vážou importin α . Naopak, NLS uvnitř polymerasové domény (aminokyseliny 320-389) se zdá být obtížně dostupný pro jaderné importiny (Moon Y.F. Tay et al. 2016).

NS5 je v infikovaných buňkách velmi často lokalizován právě v jádře. Jeho funkce zde zatím nebyly zcela potvrzeny, ale je zřejmé, že zvyšuje vazbu NF- κ B na promotor RANTES (z angl. **r**egulated on **a**ctivation, **n**ormal **T**-cell **e**xpressed and presumably **s**ecreted – jedná se o určitý druh chemokinů, tzn. látek s protizánětlivými účinky) (Khunchai et al. 2015). Je to další z možných vysvětlení aktivace cytokinů při „cytokinových bouřích“ a s tím spojeným DSS.

4.4.3 Spojení MTasové a RdRP domény

Na rozhraní těchto dvou domén se nacházejí dvě důležitá místa: hydrofobní síť (z angl. hydrophobic network) a GTR sekvence. Hydrofobní síť tvoří 6 zbytků – Pro113, Leu115 a Trp121 z MTasy a Phe467, Phe351 a Pro585 z RdRP. GTR sekvence zaujímá konec MTasy (3 aminokyseliny) a interaguje s Trp121. Mutagenní analýzou výše zmíněných aminokyselinových zbytků bylo prokázáno, že jsou esenciální pro replikaci a produkci nových virů (X. D. Li et al. 2014).

4.5 Interakce NS3 a NS5 proteinu

Helikasová doména III (aminokyseliny 482-618) interaguje s β NLS polymerázové domény NS5. Asn570 z domény III se ukázal být esenciálním pro interakci mezi těmito dvěma enzymy, ale zjistilo se, že jeho mutace nemá vliv na ATPasovou aktivitu helikasy. Komplex NS3-NS5 s mutovaným Asn570 vykazoval sníženou schopnost produkce nových proteinů i infekčních virionů a způsoboval hromadění -ssRNA vláken. Interakce NS3 a NS5 je podstatná pro fungování flavivirů, a tudíž je i možným cílem nových léčiv (Moon Y.F. Tay et al. 2015).

5. Závěr

Proteiny s enzymatickou aktivitou hrají velkou roli v replikačním cyklu flavivirů. Jelikož se většina replikačního cyklu odehrává v různých buněčných kompartmentech, musí být tyto viry vybaveny genomově úsporným množstvím enzymů s rozličnými aktivitami. Proteasa flavivirů je zodpovědná za sestřih polyproteinového prekursoru, helikasa napomáhá rozvíjení dvouvlákna – replikativní formy RNA při replikaci genomu a RNA-dependentní-RNA-polymerasa je nezbytná pro syntézu nových RNA. Proces replikace a následné úpravy mRNA je velmi komplexní a uplatňuje se při něm většina nestrukturních proteinů. Pro syntézu methylguanosinové čepičky je nezbytná jak RTPasová aktivita proteinu NS3, tak GTasová, NTPasová a MTasová aktivita proteinu NS5. To, že se nachází mnoho různých aktivit na jednom proteinu není náhodné, jednotlivé domény spolu velmi úzce interagují jak v rámci proteinu, tak i v rámci proteomu těchto virů. NS3 protein potřebuje ke správnému fungování kofaktory, NS2B a NS4B, které jsou kromě hlavních enzymů také možnými terapeutickými cíli.

Existuje několik inhibitorů NS3 a NS5 proteinu, stejně jako inhibitorů strukturních proteinů a proteinů bez enzymové aktivity. Aprotinin, jako jediný nespecifický inhibitor serinových proteas, dokáže zabránit vstupu substrátu do aktivního místa (Aleshin et al. 2007). Bylo též vyvinuto několik specifických inhibitorů NS2B-NS3, ale žádný zatím neprošel klinickými testy. Co se týče inhibitorů helikasy, nejsou příliš zkoumány, ale z nekompetitivních inhibitorů je znám suramin (Basavannacharya and Vasudevan 2014). Polymerasová aktivita NS5 proteinu může být inhibována nukleosidovými analogy (3'dGTP (Yap et al. 2007) nebo nenukleosidovými inhibitory (Ivermectin (M. Y.F. Tay et al. 2013)).

Dalšími cíli výzkumu mohou být interakce enzymů mezi sebou a díky tomu možnost inhibovat více interakčních partnerů najednou, například NLS v polymerázové doméně, který je důležitý pro správnou funkci jak helikasy, tak polymerasy (Moon Y.F. Tay et al. 2015).

Flavivirové enzymy vykazují velmi zajímavé a ne zcela prozkoumané vlastnosti jako je nutnost aktivace jejich proteasy fragmentem NS2B, jehož přesná membránová lokalizace je nejasná, stejně tak jako mechanismus aktivace a jeho regulace. Stejně tak nejsou jasné sekvenční požadavky helikasy na specifické rozpoznávání RNA substrátu, interakce domén mezi sebou a s jinými interakčními partnery. Ve srovnání s prozkoumanějšími enzymy (např. HIV proteasa) není známo příliš ligandů ovlivňujících aktivity těchto proteinů. Nové objevy v této oblasti mohou přinést zajímavé virologické a biochemické poznatky, z nichž některé mohou mít i medicínské aplikace.

6. Seznam literatury

- Ackermann, Matt, and R. Padmanabhan. 2001. "De Novo Synthesis of RNA by the Dengue Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Exhibits Temperature Dependence at the Initiation but Not Elongation Phase." *Journal of Biological Chemistry* 276 (43): 39926–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104248200>.
- Addis, Siti Nor Khadijah, Eva Lee, Jayaram Bettadapura, and Mario Lobigs. 2015. "Proteolytic Cleavage Analysis at the Murray Valley Encephalitis Virus NS1-2A Junction." *Virology Journal* 12 (1). Virology Journal: 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0375-4>.
- Aleshin, Alexander E., Sergey A. Shiryayev, Alex Y. Strongin, and Robert C. Liddington. 2007. "Structural Evidence for Regulation and Specificity of Flaviviral Proteases and Evolution of the *Flaviviridae* Fold." *Protein Science* 16 (5): 795–806. <https://doi.org/10.1110/ps.072753207>.
- Ashour, J., M. Laurent-Rolle, P.-Y. Shi, and A. Garcia-Sastre. 2009. "NS5 of Dengue Virus Mediates STAT2 Binding and Degradation." *Journal of Virology* 83 (11): 5408–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.02188-08>.
- Assenberg, R., E. Mastrangelo, T. S. Walter, A. Verma, M. Milani, R. J. Owens, D. I. Stuart, J. M. Grimes, and E. J. Mancini. 2009. "Crystal Structure of a Novel Conformational State of the Flavivirus NS3 Protein: Implications for Polyprotein Processing and Viral Replication." *Journal of Virology* 83 (24): 12895–906. <https://doi.org/10.1128/JVI.00942-09>.
- Avirutnan, Panisadee, Nuntaya Punyadee, Sansanee Noisakran, Chulaluk Komoltri, Somchai Thiemmea, Kusuma Auethavornanan, Aroonroong Jairungsri, et al. 2006. "Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: A Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement." *The Journal of Infectious Diseases* 193 (8): 1078–88. <https://doi.org/10.1086/500949>.
- Bagasra, Omar, Krishna C. Addanki, Gregory R. Goodwin, Brandon W. Hughes, Pratima Pandey, and Ewen McLean. 2017. "Cellular Targets and Receptor of Sexual Transmission of Zika Virus." *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 25 (10): 679–86. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000580>.
- Basavannacharya, Chandrakala, and Subhash G. Vasudevan. 2014. "Suramin Inhibits Helicase Activity of NS3 Protein of Dengue Virus in a Fluorescence-Based High Throughput Assay Format." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 453 (3). Elsevier Inc.: 539–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.113>.
- Beatty, P. Robert, Henry Puerta-Guardo, Sarah S. Killingbeck, Dustin R. Glasner, Kaycie Hopkins, and Eva Harris. 2015. "Dengue Virus NS1 Triggers Endothelial Permeability and Vascular Leak That Is Prevented by NS1 Vaccination." *Science Translational Medicine* 7 (304). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3787>.
- Bharaj, Preeti, Harendra S. Chahar, Anubhav Pandey, Kavita Diddi, Lalit Dar, Randeep Guleria, Sushil K. Kabra, and Shobha Broor. 2008. "Concurrent Infections by All Four Dengue Virus Serotypes during an Outbreak of Dengue in 2006 in Delhi, India." *Virology Journal* 5: 1–5. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-1>.

- Bhatt, S, PW Gething, OJ Brady, JP Messina, AW Farlow, and CL Moyes. 2012. "The Global Distribution and Burden of Dengue." *NIH-PA Author Manuscript Nature* 496 (7446): 504–7.
<https://doi.org/10.1038/nature12060>.The.
- Biedrzycka, A., M. R. Cauchi, A. Bartholomeusz, J. J. Gorman, and P. J. Wright. 1987. "Characterization of Protease Cleavage Sites Involved in the Formation of the Envelope Glycoprotein and Three Non-Structural Proteins of Dengue Virus Type 2, New Guinea C Strain." *Journal of General Virology* 68 (5): 1317–26.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-5-1317>.
- Brasil, P, M E Moreira, R M Ribeiro Nogueira, L Damasceno, M Wakimoto, R S Rabello, S G Valderramos, et al. 2017. "Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro." *N Engl J Med* 375 (24): 2321–34.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602412>.Zika.
- Brinkworth, Ross I., David P. Fairlie, Donmienne Leung, and Paul R. Young. 1999. "Homology Model of the Dengue 2 Virus NS3 Protease: Putative Interactions with Both Substrate and NS2B Cofactor." *Journal of General Virology* 80 (5): 1167–77. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-5-1167>.
- Bryant, Juliet E., Amanda E. Calvert, Kyeen Mesesan, Mary B. Crabtree, Katharine E. Volpe, Shawn Silengo, Richard M. Kinney, Claire Y.H. Huang, Barry R. Miller, and John T. Roehrig. 2007. "Glycosylation of the Dengue 2 Virus E Protein at N67 Is Critical for Virus Growth in Vitro but Not for Growth in Intrathoracically Inoculated *Aedes Aegypti* Mosquitoes." *Virology* 366 (2): 415–23.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.007>.
- Bussetta, Cécile, and Kyung H Choi. 2013. "Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) Adopts Multiple Conformations in Solution." *Biochemistry* 51 (30): 5921–31. <https://doi.org/10.1021/bi300406n>.Dengue.
- Canard, Bruno, Kajal Chowdhury, Robert Sarfati, Sylvie Doublé, and Charles C. Richardson. 1999. "The Motif D Loop of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Is Critical for Nucleoside 5'-triphosphate Selectivity." *Journal of Biological Chemistry* 274 (50): 35768–76.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.50.35768>.
- Cao, Xiacong, Yajuan Li, Xiangyu Jin, Yuelong Li, Feng Guo, and Tengchuan Jin. 2016. "Molecular Mechanism of Divalent-Metal-Induced Activation of NS3 Helicase and Insights into Zika Virus Inhibitor Design." *Nucleic Acids Research* 44 (21): 10505–14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw941>.
- Clum, S, K Ebner, and R Padmanabhan. 1997. "Cotranslational Membrane Insertion of the Serine Proteinase Precursor NS2B-NS3 (Pro) of Dengue Virus" *Journal of Biological Chemistry* 272 (49): 30715–23.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.49.30715>.
- Clyde, Karen, and Eva Harris. 2006. "RNA Secondary Structure in the Coding Region of Dengue Virus Type 2 Directs Translation Start Codon Selection and Is Required for Viral Replication" 80 (5): 2170–82.
<https://doi.org/10.1128/JVI.80.5.2170>.
- Coloma, Javier, Rinku Jain, Kanagalaghatta R Rajashankar, Aneel K Aggarwal, and Advanced Photon Source. 2016. "HHS Public Access" 16 (12): 3097–3102. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.091>.Structures.

- Crabtree, M. B., R. M. Kinney, and B. R. Miller. 2005. "Deglycosylation of the NS1 Protein of Dengue 2 Virus, Strain 16681: Construction and Characterization of Mutant Viruses." *Archives of Virology* 150 (4): 771–86. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0430-8>.
- Cruz-Oliveira, Christine, João Miguel Freire, Thaís M. Conceição, Luiza M. Higa, Miguel A.R.B. Castanho, and Andrea T. Da Poian. 2015. "Receptors and Routes of Dengue Virus Entry into the Host Cells." *FEMS Microbiology Reviews* 39 (2): 155–70. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu004>.
- Dong, Hongping, Katja Fink, Roland Züst, Siew Pheng Lim, Cheng Feng Qin, and Pei Yong Shi. 2014. "Flavivirus RNA Methylation." *Journal of General Virology*. <https://doi.org/10.1099/vir.0.062208-0>.
- Duan, Wenqian, Hao Song, Haiyuan Wang, Yan Chai, Chao Su, Jianxun Qi, Yi Shi, and George F Gao. 2017. "The Crystal Structure of Zika Virus NS5 Reveals Conserved Drug Targets." *The EMBO Journal* 36 (7): 919–33. <https://doi.org/10.15252/embj.201696241>.
- Egloff, M P, D Benarroch, B Selisko, J L Romette, and B Canard. 2002. "An RNA Cap (Nucleoside-2'-O)-Methyltransferase in the Flavivirus RNA Polymerase NS5: Crystal Structure and Functional Characterization." *The EMBO Journal* 21 (11): 2757–68. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2757>.
- Erbel, Paul, Nikolaus Schiering, Allan D'Arcy, Martin Renatus, Markus Kroemer, Siew Pheng Lim, Zheng Yin, Thomas H. Keller, Subhash G. Vasudevan, and Ulrich Hommel. 2006. "Structural Basis for the Activation of Flaviviral NS3 Proteases from Dengue and West Nile Virus." *Nature Structural and Molecular Biology* 13 (4): 372–73. <https://doi.org/10.1038/nsmb1073>.
- Falgout, B, M Pethel, Y M Zhang, and C J Lai. 1991. "Both Nonstructural Proteins Ns2B and Ns3 Are Required for the Proteolytic Processing of Dengue Virus Nonstructural Proteins." *Journal of Virology* 65 (5): 2467–75.
- Falgout, Barry, Roger H Miller, and Ching-Juh Lai '. 1993. "Deletion Analysis of Dengue Virus Type 4 Nonstructural Protein NS2B: Identification of a Domain Required for NS2B-NS3 Protease Activity." *Journal of Virology* 67 (4): 2034–42.
- Freire, João M., Nuno C. Santos, Ana Salomé Veiga, Andrea T. Da Poian, and Miguel A.R.B. Castanho. 2015. "Rethinking the Capsid Proteins of Enveloped Viruses: Multifunctionality from Genome Packaging to Genome Transfection." *FEBS Journal* 282 (12): 2267–78. <https://doi.org/10.1111/febs.13274>.
- Freire, Joao Miguel, Ana Salome Veiga, Thaís M. Conceição, Wioleta Kowalczyk, Ronaldo Mohana-Borges, David Andreu, Nuno C. Santos, Andrea T. Da Poian, and Miguel A.R.B. Castanho. 2013. "Intracellular Nucleic Acid Delivery by the Supercharged Dengue Virus Capsid Protein." *PLoS ONE* 8 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081450>.
- Gibbs, Alan C, Ruth Steele, Gaohua Liu, Brett A Tounge, and Gaetano Montelione. 2018. "Inhibitor Bound Dengue NS2B-NS3pro Reveals Multiple Dynamic Binding Modes." <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01127>.
- Gorbalenya, Alexander E., and Eugene V. Koonin. 1993. "Helicases: Amino Acid Sequence Comparisons and

- Structure-Function Relationships.” *Current Opinion in Structural Biology* 3 (3): 419–29.
[https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(05\)80116-2](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(05)80116-2).
- Gupta, Garvita, Liangzhong Lim, and Jianxing Song. 2015. “NMR and MD Studies Reveal That the Isolated Dengue NS3 Protease Is an Intrinsically Disordered Chymotrypsin Fold Which Absolutely Requests NS2B for Correct Folding and Functional Dynamics.” *PLoS ONE* 10 (8): 1–24.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134823>.
- Gutsche, I., F. Coulibaly, J. E. Voss, J. Salmon, J. d’Alayer, M. Ermonval, E. Larquet, et al. 2011. “Secreted Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Is an Atypical Barrel-Shaped High-Density Lipoprotein.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (19): 8003–8.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1017338108>.
- Hahn, Chang S., Young S. Hahn, Charles M. Rice, Eva Lee, Lynn Dalgarno, Ellen G. Strauss, and James H. Strauss. 1987. “Conserved Elements in the 3’ Untranslated Region of Flavivirus RNAs and Potential Cyclization Sequences.” *Journal of Molecular Biology* 198 (1): 33–41. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90455-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90455-4).
- Hamel, Rodolphe, Ophélie Dejarnac, Sineewanlaya Wichit, Peeraya Ekchariyawat, Aymeric Neyret, Natthanej Luplertlop, Manuel Perera-Lecoin, et al. 2015. “Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells.” *Journal of Virology* 89 (17): 8880–96. <https://doi.org/10.1128/JVI.00354-15>.
- Hönig, V., P. Svec, P. Halas, Z. Vavruskova, H. Tykalova, P. Kilian, V. Vetiskova, et al. 2015. “Ticks and Tick-Borne Pathogens in South Bohemia (Czech Republic) - Spatial Variability in Ixodes Ricinus Abundance, Borrelia Burgdorferi and Tick-Borne Encephalitis Virus Prevalence.” *Ticks and Tick-Borne Diseases* 6 (5). Elsevier GmbH.: 559–67. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.04.010>.
- Hundt, Christoph, Jean Michel Peyrin, Stéphane Haïk, Sabine Gauczynski, Christoph Leucht, Roman Rieger, Maria Louise Riley, et al. 2001. “Identification of Interaction Domains of the Prion Protein with Its 37-kDa/67-kDa Laminin Receptor.” *EMBO Journal* 20 (21): 5876–86.
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.5876>.
- Chang, David C., Long T. Hoang, Ahmad Nazri Mohamed Naim, Hongping Dong, Mark J. Schreiber, Martin L. Hibberd, Min Jie Alvin Tan, and Pei Yong Shi. 2016. “Evasion of Early Innate Immune Response by 2'-O-Methylation of Dengue Genomic RNA.” *Virology* 499. Elsevier: 259–66.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.09.022>.
- Chatel-Chaix, Laurent, Wolfgang Fischl, Pietro Scaturro, Mirko Cortese, Stephanie Kallis, Marie Bartenschlager, Bernd Fischer, and Ralf Bartenschlager. 2015. “A Combined Genetic-Proteomic Approach Identifies Residues within Dengue Virus NS4B Critical for Interaction with NS3 and Viral Replication.” *Journal of Virology* 89 (14): 7170–86. <https://doi.org/10.1128/JVI.00867-15>.
- Chen, Wan Na, Karin V. Loscha, Christoph Nitsche, Bim Graham, and Gottfried Otting. 2014. “The Dengue Virus NS2B-NS3 Protease Retains the Closed Conformation in the Complex with BPTI.” *FEBS Letters* 588 (14). Federation of European Biochemical Societies: 2206–11.

<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.018>.

- Choksupmanee, Opas, Kenneth Hodge, Gerd Katzenmeier, and Sarin Chinnaronk. 2012. "Structural Platform for the Autolytic Activity of an Intact NS2B-NS3 Protease Complex from Dengue Virus." *Biochemistry* 51 (13): 2840–51. <https://doi.org/10.1021/bi2018267>.
- Issur, M., B. J. Geiss, I. Bougie, F. Picard-Jean, S. Despins, J. Mayette, S. E. Hobdey, and M. Bisaillon. 2009. "The Flavivirus NS5 Protein Is a True RNA Guanylyltransferase That Catalyzes a Two-Step Reaction to Form the RNA Cap Structure." *Rna* 15 (12): 2340–50. <https://doi.org/10.1261/rna.1609709>.
- Jessie, Kala, Mun Yik Fong, Shamala Devi, Sai Kit Lam, and K. Thong Wong. 2004. "Localization of Dengue Virus in Naturally Infected Human Tissues, by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization." *The Journal of Infectious Diseases* 189 (8): 1411–18. <https://doi.org/10.1086/383043>.
- Johansson, M., A. J. Brooks, D. A. Jans, and S. G. Vasudevan. 2001. "A Small Region of the Dengue Virus-Encoded RNA-Dependent RNA Polymerase, NS5, Confers Interaction with Both the Nuclear Transport Receptor Importin- β and the Viral Helicase, NS3." *Journal of General Virology* 82 (4): 735–45. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-4-735>.
- Khunchai, Sasiprapa, Mutita Junking, Aroonroong Suttitheptumrong, Suwattanee Kooptiwut, Guy Haegeman, Thawornchai Limjindaporn, and Pa Thai Yenchitsomanus. 2015. "NF- κ B Is Required for Dengue Virus NS5-Induced RANTES Expression." *Virus Research* 197. Elsevier B.V.: 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.12.007>.
- Khunchai, Sasiprapa, Mutita Junking, Aroonroong Suttitheptumrong, Umpa Yasamut, Nunghathai Sawasdee, Janjuree Netsawang, Atthapan Morchang, et al. 2012. "Interaction of Dengue Virus Nonstructural Protein 5 with Daxx Modulates RANTES Production." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 423 (2): 398–403. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.137>.
- Kim, Young Mee, Shovanlal Gayen, Cong Bao Kang, Joma Joy, Qiwei Huang, Angela Shuyi Chen, John Liang Kuan Wee, et al. 2013. "NMR Analysis of a Novel Enzymatically Active Unlinked Dengue NS2B-NS3 Protease Complex." *Journal of Biological Chemistry* 288 (18): 12891–900. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.442723>.
- Kuhn, Richard J., Wei Zhang, Michael G. Rossmann, Sergei V. Pletnev, Jeroen Corver, Edith Lenches, Christopher T. Jones, et al. 2002. "Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion." *Cell* 108 (5): 717–25. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00660-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00660-8).
- Kuiper, Benjamin D., Kristin Slater, Nicholas Spellmon, Joshua Holcomb, Prasanna Medapureddy, Kendall M. Muzzarelli, Zhe Yang, et al. 2017. "Increased Activity of Unlinked Zika Virus NS2B/NS3 Protease Compared to Linked Zika Virus Protease." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 492 (4). Elsevier Ltd: 668–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.108>.
- Kuno, Goro, Gwong-jen J Chang, K Richard Tsuchiya, Nick Karabatsos, and C Bruce Cropp. 1998. "Phylogeny of the Genus Flavivirus." *Journal of Virology* 72 (1): 73–83. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0874>.

- Lawitz, Eric J., William D. O’Riordan, Armen Asatryan, Bradley L. Freilich, Terry D. Box, J. Scott Overcash, Sandra Lovell, et al. 2016. “Potent Antiviral Activities of the Direct-Acting Antivirals ABT-493 and ABT-530 with Three-Day Monotherapy for Hepatitis C Virus Genotype 1 Infection.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (3): 1546–55. <https://doi.org/10.1128/AAC.02264-15>.
- Lee, Chia Min, Xuping Xie, Jing Zou, Shi-Hua Li, Michelle Yue Qi Lee, Hongping Dong, Cheng-Feng Qin, Congbao Kang, and Pei-Yong Shi. 2015. “Determinants of Dengue Virus NS4A Protein Oligomerization.” *Journal of Virology* 89 (12): 6171–83. <https://doi.org/10.1128/JVI.00546-15>.
- Li, H, S Clum, S You, K E Ebner, and R Padmanabhan. 1999. “The Serine Protease and RNA-Stimulated Nucleoside Triphosphatase and RNA Helicase Functional Domains of Dengue Virus Type 2 NS3 Converge within a Region of 20 Amino Acids.” *Journal of Virology* 73 (4): 3108–16. <http://jvi.asm.org/content/73/4/3108.abstract>.
- Li, Haitao, Stephen Clum, Shihyun You, Kurt E Ebner, and R Padmanabhan. 1999. “The Serine Protease and RNA-Stimulated Nucleoside Triphosphatase and RNA Helicase Functional Domains of Dengue Virus Type 2 NS3 Converge within a Region of 20 Amino Acids” 73 (4): 3108–16.
- Li, Xiao Dan, Chao Shan, Cheng Lin Deng, Han Qing Ye, Pei Yong Shi, Zhi Ming Yuan, Peng Gong, and Bo Zhang. 2014. “The Interface between Methyltransferase and Polymerase of NS5 Is Essential for Flavivirus Replication.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002891>.
- Li, Yan, Qingxin Li, Ying Lei Wong, Lynette Sin Yee Liew, and Congbao Kang. 2015. “Membrane Topology of NS2B of Dengue Virus Revealed by NMR Spectroscopy.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1848 (10). Elsevier B.V.: 2244–52. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.06.010>.
- Liang, Qiming, Zhifei Luo, Jianxiong Zeng, Weiqiang Chen, Suan Sin Foo, Shin Ae Lee, Jianning Ge, et al. 2016. “Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy.” *Cell Stem Cell* 19 (5): 663–71. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.019>.
- Lindenbach, Brett D, and Charles M Rice. 1999. “Genetic Interaction of Flavivirus Nonstructural Proteins NS1 and NS4A as a Determinant of Replicase Function.” *JOURNAL OF VIROLOGY* 73 (6): 4611–21.
- Liu, Lihui, Hongping Dong, Hui Chen, Jing Zhang, Hua Ling, Zhong Li, Pei Yong Shi, and Hongmin Li. 2010. “Flavivirus RNA Cap Methyltransferase: Structure, Function, and Inhibition.” *Frontiers of Biology in China* 5 (4): 286–303. <https://doi.org/10.1007/s11515-010-0660-y>.
- Liu, Limei, Yanping Tian, Na Gao, Zong tao Chen, Heng Zhang, and Jing An. 2010. “Application of Antibodies against Nonstructural Protein 2B of Dengue Serotype 2 Virus Induced by DNA Immunisation or Recombinant Protein NS 2B Immunisation in BALB/c Mice.” *Journal of Virological Methods* 163 (1): 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.04.011>.
- Lorenz, Ivo C, Steven L Allison, Franz X Heinz, and Ari Helenius. 2002. “Folding and Dimerization of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Proteins prM and E in the Endoplasmic Reticulum.” *Journal of Virology* 76 (11): 5480–91. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.11.5480>.

- Luo, Dahai, Ting Xu, Cornelia Hunke, and Gerhard Gru. 2008. "Crystal Structure of the NS3 Protease-Helicase from Dengue Virus □" 82 (1): 173–83. <https://doi.org/10.1128/JVI.01788-07>.
- Ma, Lixin, Christopher T Jones, Teresa D Groesch, Richard J Kuhn, and Carol Beth Post. 2004. "Solution Structure of Dengue Virus Capsid Protein Reveals Another Fold." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (10): 3414–19. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305892101>.
- Mackenzie, Jason M, Malcolm K Jones, and Paul R Young. 1996. "SHORT COMMUNICATION Immunolocalization of the Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Suggests a Role in Viral RNA Replication" 240 (220): 232–40.
- Malet, Hélène, Nicolas Massé, Barbara Selisko, Jean Louis Romette, Karine Alvarez, Jean Claude Guillemot, Hughes Tolou, et al. 2008. "The Flavivirus Polymerase as a Target for Drug Discovery." *Antiviral Research* 80 (1): 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.06.007>.
- Meertens, Laurent, Xavier Carnec, Manuel Perera Lecoin, Rasika Ramdasi, Florence Guivel-Benhassine, Erin Lew, Greg Lemke, Olivier Schwartz, and Ali Amara. 2012. "The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry." *Cell Host and Microbe* 12 (4): 544–57. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.009>.
- Miller, Sven, Stefan Kastner, Jacomine Krijnse-Locker, Sandra Bühler, and Ralf Bartenschlager. 2007. "The Non-Structural Protein 4A of Dengue Virus Is an Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-Regulated Manner." *Journal of Biological Chemistry* 282 (12): 8873–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609919200>.
- Miller, Sven, Sandra Sparacio, and Ralf Bartenschlager. 2006. "Subcellular Localization and Membrane Topology of the Dengue Virus Type 2 Non-Structural Protein 4B." *Journal of Biological Chemistry* 281 (13): 8854–63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512697200>.
- Modhiran, N., D. Watterson, D. A. Muller, A. K. Panetta, D. P. Sester, L. Liu, D. A. Hume, K. J. Stacey, and P. R. Young. 2015. "Dengue Virus NS1 Protein Activates Cells via Toll-like Receptor 4 and Disrupts Endothelial Cell Monolayer Integrity." *Science Translational Medicine* 7 (304): 304ra142-304ra142. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3863>.
- Modis, Yorgo, Steven Ogata, David Clements, and Stephen C Harrison. 2003. "A Ligand-Binding Pocket in the Dengue Virus Envelope Glycoprotein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (12): 6986–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0832193100>.
- Mossenta, M., S. Marchese, M. Poggianella, J. L. Slon Campos, and O. R. Burrone. 2017. "Role of N-Glycosylation on Zika Virus E Protein Secretion, Viral Assembly and Infectivity." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 492 (4). Elsevier Ltd: 579–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.022>.
- Mottin, Melina, Rodolpho C. Braga, Roosevelt A. da Silva, Joao H. Martins da Silva, Alexander L. Perryman, Sean Ekins, and Carolina Horta Andrade. 2017. "Molecular Dynamics Simulations of Zika Virus NS3 Helicase: Insights into RNA Binding Site Activity." *Biochemical and Biophysical Research*

- Communications* 492 (4). Elsevier Ltd: 643–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.070>.
- Munoz-Jordan, J. L., G. G. Sanchez-Burgos, M. Laurent-Rolle, and A. Garcia-Sastre. 2003. “Inhibition of Interferon Signaling by Dengue Virus.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (24): 14333–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.2335168100>.
- Noble, C. G., C. C. Seh, A. T. Chao, and P. Y. Shi. 2012. “Ligand-Bound Structures of the Dengue Virus Protease Reveal the Active Conformation.” *Journal of Virology* 86 (1): 438–46. <https://doi.org/10.1128/JVI.06225-11>.
- Oliveira, Edson R.A., Ricardo B. de Alencastro, and Bruno A.C. Horta. 2017. “New Insights into Flavivirus Biology: The Influence of pH over Interactions between prM and E Proteins.” *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 31 (11). Springer International Publishing: 1009–19. <https://doi.org/10.1007/s10822-017-0076-8>.
- Ong, Adrian, Mya Sandar, Mark I. Chen, and Leo Yee Sin. 2007. “Fatal Dengue Hemorrhagic Fever in Adults during a Dengue Epidemic in Singapore.” *International Journal of Infectious Diseases* 11 (3): 263–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2006.02.012>.
- Pasternak, a, D Ringe, and L Hedstrom. 1999. “Comparison of Anionic and Cationic Trypsinogens: The Anionic Activation Domain Is More Flexible in Solution and Differs in Its Mode of BPTI Binding in the Crystal Structure.” *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 8 (1): 253–58. <https://doi.org/10.1110/ps.8.1.253>.
- Perera, Rushika, and Richard J. Kuhn. 2008. “Structural Proteomics of Dengue Virus.” *Current Opinion in Microbiology* 11 (4): 369–77. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.004>.
- Phoo, Wint Wint, Yan Li, Zhenzhen Zhang, Michelle Yueqi Lee, Ying Ru Loh, Yaw Bia Tan, Elizabeth Yihui Ng, Julien Lescar, Congbao Kang, and Dahai Luo. 2016. “Structure of the NS2B-NS3 Protease from Zika Virus after Self-Cleavage.” *Nature Communications* 7. Nature Publishing Group: 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms13410>.
- Raboisson, Pierre, Herman de Kock, Åsa Rosenquist, Magnus Nilsson, Lourdes Salvador-Oden, Tse I. Lin, Natalie Roue, et al. 2008. “Structure-Activity Relationship Study on a Novel Series of Cyclopentane-Containing Macrocyclic Inhibitors of the Hepatitis C Virus NS3/4A Protease Leading to the Discovery of TMC435350.” *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 18 (17): 4853–58. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.07.088>.
- Salvador, El. 2016. “Zika Virus and the Guillain – Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries,” 2016–19.
- Shannon, A. E., K. J. Chappell, M. J. Stoermer, S. Y. Chow, W. M. Kok, D. P. Fairlie, and P. R. Young. 2016. “Simultaneous Uncoupled Expression and Purification of the Dengue Virus NS3 Protease and NS2B Co-Factor Domain.” *Protein Expression and Purification* 119. Elsevier Ltd: 124–29. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.11.022>.

- Shu, Bo, and Peng Gong. 2017. "The Uncoupling of Catalysis and Translocation in the Viral RNA-Dependent RNA Polymerase." *RNA Biology* 14 (10). Taylor & Francis: 1314–19. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1300221>.
- Silva, Ivan Rocha Ferreira Da, Jennifer A. Frontera, Ana Maria Bispo De Filippis, and Osvaldo Jose Moreira Do Nascimento. 2017. "Neurologic Complications Associated with the Zika Virus in Brazilian Adults." *JAMA Neurology* 74 (10): 1190–98. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.1703>.
- Stage, B, C Stage, D Stage, E Stage, and F Stage. 2000. "VIRAL AND CELLULAR mRNA CAPPING : PAST AND PROSPECTS Yasuhiro Furuichi 1 and Aaron J . Shatkin 2" 55.
- Stern, O., Y.-F. Hung, O. Valdau, Y. Yaffe, E. Harris, S. Hoffmann, D. Willbold, and E. H. Sklan. 2013. "An N-Terminal Amphipathic Helix in Dengue Virus Nonstructural Protein 4A Mediates Oligomerization and Is Essential for Replication." *Journal of Virology* 87 (7): 4080–85. <https://doi.org/10.1128/JVI.01900-12>.
- Summa, Vincenzo, Steven W. Ludmerer, John A. McCauley, Christine Fandozzi, Christine Burlein, Giuliano Claudio, Paul J. Coleman, et al. 2012. "MK-5172, a Selective Inhibitor of Hepatitis C Virus NS3/4a Protease with Broad Activity across Genotypes and Resistant Variants." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (8): 4161–67. <https://doi.org/10.1128/AAC.00324-12>.
- Tay, M. Y.F., J. E. Fraser, W. K.K. Chan, N. J. Moreland, A. P. Rathore, C. Wang, S. G. Vasudevan, and D. A. Jans. 2013. "Nuclear Localization of Dengue Virus (DENV) 1-4 Non-Structural Protein 5; Protection against All 4 DENV Serotypes by the Inhibitor Ivermectin." *Antiviral Research* 99 (3). Elsevier B.V.: 301–6. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.06.002>.
- Tay, Moon Y.F., Wuan Geok Saw, Yongqian Zhao, Kitti W.K. Chan, Daljit Singh, Yuwen Chong, Jade K. Forwood, et al. 2015. "The C-Terminal 50 Amino Acid Residues of Dengue NS3 Protein Are Important for NS3-NS5 Interaction and Viral Replication." *Journal of Biological Chemistry* 290 (4): 2379–94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.607341>.
- Tay, Moon Y.F., Kate Smith, Ivan H.W. Ng, Kitti W.K. Chan, Yongqian Zhao, Eng Eong Ooi, Julien Lescar, et al. 2016. "The C-Terminal 18 Amino Acid Region of Dengue Virus NS5 Regulates Its Subcellular Localization and Contains a Conserved Arginine Residue Essential for Infectious Virus Production." *PLoS Pathogens* 12 (9): 1–34. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005886>.
- Tian, Hongliang, Xiaoyun Ji, Xiaoyun Yang, Wei Xie, Kailin Yang, Cheng Chen, Chen Wu, et al. 2016. "The Crystal Structure of Zika Virus Helicase: Basis for Antiviral Drug Design." *Protein and Cell* 7 (6): 450–54. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0275-4>.
- Tian, Hongliang, Xiaoyun Ji, Xiaoyun Yang, Zhongxin Zhang, Zuokun Lu, Kailin Yang, Cheng Chen, et al. 2016. "Structural Basis of Zika Virus Helicase in Recognizing Its Substrates." *Protein and Cell* 7 (8). Higher Education Press: 562–70. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0293-2>.
- Umareddy, Indira, Alex Chao, Aruna Sampath, Feng Gu, and Subhash G. Vasudevan. 2006. "Dengue Virus NS4B Interacts with NS3 and Dissociates It from Single-Stranded RNA." *Journal of General Virology* 87 (9): 2605–14. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81844-0>.

- Voet, Donald, and Judith G. Voet. 2005. "Biochemie."
- Wang, Boxiao, Stephanie Thurmond, Rong Hai, and Jikui Song. 2018. "Structure and Function of Zika Virus NS5 Protein: Perspectives for Drug Design." *Cellular and Molecular Life Sciences*, no. 123456789. Springer International Publishing: 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2751-x>.
- Welsch, Sonja, Sven Miller, Ines Romero-Brey, Andreas Merz, Christopher K.E. Bleck, Paul Walther, Stephen D. Fuller, Claude Antony, Jacomine Krijnse-Locker, and Ralf Bartenschlager. 2009. "Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites." *Cell Host and Microbe* 5 (4): 365–75. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>.
- Wengler, Gerd, and Gisela Wengler. 1981. "Terminal Sequences of the Genome and Replication-Form RNA of the Flavivirus West Nile Virus: Absence of poly(A) and Possible Role in RNA Replication." *Virology* 113 (2): 544–55. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(81\)90182-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(81)90182-3).
- Wu, Chia Fen, Shao Hung Wang, Chang Ming Sun, Shau Ting Hu, and Wan Jr Syu. 2003. "Activation of Dengue Protease Autocleavage at the NS2B-NS3 Junction by Recombinant NS3 and GST-NS2B Fusion Proteins." *Journal of Virological Methods* 114 (1): 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.09.001>.
- Xie, X., S. Gayen, C. Kang, Z. Yuan, and P.-Y. Shi. 2013. "Membrane Topology and Function of Dengue Virus NS2A Protein." *Journal of Virology* 87 (8): 4609–22. <https://doi.org/10.1128/JVI.02424-12>.
- Xu, Ting, Aruna Sampath, Alex Chao, Daying Wen, Patrick Chene, Subhash G Vasudevan, and Julien Lescar. 2005. "Structure of the Dengue Virus Helicase / Nucleoside Triphosphatase Catalytic Domain at a Resolution of 2 . 4 Å Structure of the Dengue Virus Helicase / Nucleoside Triphosphatase Catalytic Domain at a Resolution of 2 . 4 Å." *Journal of Virology* 79 (16): 10278–88. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10278>.
- Yap, T. L., T. Xu, Y.-L. Chen, H. Malet, M.-P. Egloff, B. Canard, S. G. Vasudevan, and J. Lescar. 2007. "Crystal Structure of the Dengue Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Catalytic Domain at 1.85-Angstrom Resolution." *Journal of Virology* 81 (9): 4753–65. <https://doi.org/10.1128/JVI.02283-06>.
- Yoon, Ki Jun, Guang Song, Xuyu Qian, Jianbo Pan, Dan Xu, Hee Sool Rho, Nam Shik Kim, et al. 2017. "Zika-Virus-Encoded NS2A Disrupts Mammalian Cortical Neurogenesis by Degrading Adherens Junction Proteins." *Cell Stem Cell* 21 (3). Elsevier Inc.: 349–358.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.07.014>.
- Yu, I. Mei, Wei Zhang, Heather A. Holdaway, Long Li, Victor A. Kostyuchenko, Paul R. Chipman, Richard J. Kuhn, Michael G. Rossmann, and Jue Chen. 2008. "Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation." *Science* 319 (5871): 1834–37. <https://doi.org/10.1126/science.1153264>.
- Yusof, Rohana, Stephen Clum, Mary Wetzel, H M Krishna Murthy, R Padmanabhan, Rohana Yusof, Stephen Clum, Mary Wetzel, H M Krishna Murthy, and R Padmanabhan. 2000. "ENZYME CATALYSIS AND REGULATION : Purified NS2B / NS3 Serine Protease of Dengue Virus Type 2 Exhibits Cofactor NS2B Dependence for Cleavage of Substrates with Dibasic Amino Acids in Vitro Purified NS2B / NS3 Serine Protease of Dengue Virus Type 2 Exhibits" 275 (14): 9963–69. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.9963>.

- Zhang, Caiying, Tingting Feng, Jinbo Cheng, Yajuan Li, Xueying Yin, Weihong Zeng, Xiangyu Jin, Yuelong Li, Feng Guo, and Tengchuan Jin. 2017. "Structure of the NS5 Methyltransferase from Zika Virus and Implications in Inhibitor Design." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 492 (4). Elsevier Ltd: 624–30. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.098>.
- Zhang, Qian, Cornelia Hunke, Yin Hoe Yau, Vernon Seow, Sumarlin Lee, Lukas Bahati Tanner, Xue Li Guan, et al. 2012. "The Stem Region of Premembrane Protein Plays an Important Role in the Virus Surface Protein Rearrangement during Dengue Maturation." *Journal of Biological Chemistry* 287 (48): 40525–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.384446>.
- Zhao, Baoyu, Guanghui Yi, Fenglei Du, Yin Chih Chuang, Robert C. Vaughan, Banumathi Sankaran, C. Cheng Kao, and Pingwei Li. 2017. "Structure and Function of the Zika Virus Full-Length NS5 Protein." *Nature Communications* 8. Nature Publishing Group: 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms14762>.
- Zhao, Yongqian, Tingjin Sherryl Soh, Siew Pheng Lim, Ka Yan Chung, Kunchithapadam Swaminathan, Subhash G. Vasudevan, Pei-Yong Shi, Julien Lescar, and Dahai Luo. 2015. "Molecular Basis for Specific Viral RNA Recognition and 2'-O-Ribose Methylation by the Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5)." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (48): 14834–39. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514978112>.
- Zheng, Aihua, Mahadevaiah Umashankar, and Margaret Kielian. 2010. "In Vitro and In Vivo Studies Identify Important Features of Dengue Virus Pr-E Protein Interactions." *PLoS Pathogens* 6 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001157>.
- Zhou, Y., D. Ray, Y. Zhao, H. Dong, S. Ren, Z. Li, Y. Guo, K. A. Bernard, P.-Y. Shi, and H. Li. 2007. "Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase." *Journal of Virology* 81 (8): 3891–3903. <https://doi.org/10.1128/JVI.02704-06>.
- Zou, J., X. Xie, L. T. Lee, R. Chandrasekaran, A. Reynaud, L. Yap, Q.-Y. Wang, et al. 2014. "Dimerization of Flavivirus NS4B Protein." *Journal of Virology* 88 (6): 3379–91. <https://doi.org/10.1128/JVI.02782-13>.
- Zou, Jing, Le Tian Lee, Qing Yin Wang, Xuping Xie, Siyan Lu, Yin Hoe Yau, Zhiming Yuan, et al. 2015. "Mapping the Interactions between the NS4B and NS3 Proteins of Dengue Virus." *Journal of Virology* 89 (7): 3471–83. <https://doi.org/10.1128/JVI.03454-14>.
- Zou, Jing, Xuping Xie, Qing-Yin Wang, Hongping Dong, Michelle Yueqi Lee, Congbao Kang, Zhiming Yuan, and Pei-Yong Shi. 2015. "Characterization of Dengue Virus NS4A and NS4B Protein Interaction." *Journal of Virology* 89 (7): 3455–70. <https://doi.org/10.1128/JVI.03453-14>.
- Zuo, Z., O. W. Liew, G. Chen, P. C. J. Chong, S. H. Lee, K. Chen, H. Jiang, C. M. Pua, and W. Zhu. 2009. "Mechanism of NS2B-Mediated Activation of NS3pro in Dengue Virus: Molecular Dynamics Simulations and Bioassays." *Journal of Virology* 83 (2): 1060–70. <https://doi.org/10.1128/JVI.01325-08>.